

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

---

## **Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche**

Scuola di Dottorato in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

Settore Disciplinare BIO/16

Dipartimento di Anatomia e Istologia

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

## **FOSFOPROTEOMICA E TERAPIA PERSONALIZZATA: utilizzo di una piattaforma Reverse Phase Protein Array per predire la risposta del paziente alla farmacoterapia**

### **Tesi di Dottorato**

#### **Relatori:**

CHIAR.MO PROF. NADIR MARALDI

CHIAR.MA PROF. SANDRA MARMIROLI

#### **Presentata da:**

DOTT.SSA MARIANNA GUIDA

#### **Coordiatore:**

CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

### **XXIII CICLO**

---

**Anno Accademico 2009/2010**

# INDICE

<b>1 Abstract</b>	<b>5</b>
<b>2 Introduzione</b>	<b>8</b>
2.1 La leucemia mieloide acuta (LAM)	9
2.1.1 Classificazione	11
2.1.2 Diagnosi	18
2.1.3 Analisi citogenetiche e rischio	19
2.1.4 Alterazioni molecolari nella LAM	20
2.1.5 Alterazioni della trasduzione del segnale nella LAM	22
2.1.6 Ruolo della via di segnale PI3K/Akt/mTOR nella LAM	23
2.2 La Famiglia delle Fosfoinositide 3-chinasi: PI3K	27
2.2.1 La Protein chinasi AKT	30
2.2.2 Attivazione di Akt	31
2.2.3 mTOR	34
2.2.4 Regolazione negativa della via di segnale PI3K/Akt/mTOR	37
2.2.5 PI3K/Akt/mTOR, pathway di sopravvivenza	38
2.2.6 PI3K/Akt/mTOR nella regolazione del ciclo cellulare	39
2.2.7 PI3K/Akt/mTOR e il metabolismo cellulare	41
2.3 Inibizione di PI3K/Akt/mTOR, nuova strategia terapeutica	45
2.3.1 Inibitori di PI3K	46
2.3.2 Inibitori di Akt	46
2.3.3 Inibitori di mTOR	50
<b>3 Scopo della ricerca</b>	<b>53</b>
<b>4 Materiali e Metodi</b>	<b>57</b>
4.1 Campioni	58
4.1.1 Prima Analisi	59
4.1.2 Seconda Analisi	60
4.2 Controlli e linee cellulari	61
4.3 Reverse Phase Protein Array	62
4.3.1 Conservazione dei campioni	62
4.3.2 Estrazione Proteica	62
4.3.3 Deposizione delle Proteine su Supporto	63
4.3.4 Rivelazione delle Proteine mediante Immunostaining	64
4.3.5 Analisi dei Dati	66
4.3.6 Analisi statistica	67
4.4 Western Blot	70

<b>4.4.1 Estrazione Proteica</b>	70
<b>4.4.2 SDS page e western blot</b>	70
<b>5 Approccio Sperimentale</b>	72
<b>6 Risultati</b>	78
<b>6.1</b> Campioni provenienti da sangue midollare e periferico possono essere utilizzati indifferentemente	79
<b>6.2</b> Campioni freschi e crioconservati presentano livelli paragonabili di espressione e fosforilazione proteica	81
<b>6.3</b> Fosforiloma generale in pazienti LAM	84
<b>6.4</b> Correlazione tra profili proteici e classificazione FAB	86
<b>6.5</b> Correlazione tra profili proteici e prognosi	90
<b>6.6</b> Correlazione tra profili proteici ed espressione del recettore c-Kit	91
<b>6.7</b> Identificazione di pazienti con alti livelli di fosforilazione di Akt responsivi e non responsivi al trattamento con l'inibitore LY	94
<b>6.8</b> Trattamenti con inibitori specifici di Akt ed mTOR definiscono profili di pazienti responsivi e non	99
<b>7 Discussione</b>	103
<b>8. Conclusioni E prospettive</b>	108
<b>8 Bibliografia</b>	113

# **ABSTRACT**

Mapping of deregulated kinases and protein signalling networks within tumors can provide a means to stratify patients with shared biological characteristics to the most optimal treatment, and identify drug targets. In particular, the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways are frequently activated in blast cells from patients with acute myelogenous leukemia (AML), a neoplastic disorder characterized by the accumulation of genetically altered myelogenous cells displaying deregulated intracellular signalling pathways and aggressive clinical behavior with poor prognosis.

Using Reverse Phase Protein Microarrays (RPMA), we have analyzed the phosphorylated epitopes of signal pathway proteins of 50 peripheral blood and bone marrow specimens with newly diagnosed AML. Patients are diagnosed according to blast content, FAB classification and cytogenetic analysis. Samples are enriched for leukemic cells by performing Ficoll separation to yield a mononuclear fraction with >60% blast cells. The objective of the study was to predict the sensitivity of each patient to PI3K/Akt/mTor inhibitors, to avoid unnecessary and toxic ineffective treatment of non-responsive patients. To this goal, fresh blast cells were grown for 16 h untreated or treated with the mTor inhibitors Torin1 and Sirolimus (phase II), and the PI3K/Akt inhibitors Perifosine (phase II), AktInhVIII (phase I), Triciribine (phase I), all at high nanomolar-low micromolar dose, either alone or in combination. Then cells were

centrifuged and proteins extracted with a buffer suitable for both RPPA and western blotting analysis.

Identification of activated proteins is obtained through Wilcoxon tests or two-sample Welch t-tests implemented in multtest package (Pollard KS, Ge Y, Taylor S, Dudoit S (2008) Multtest: Resampling-based multiple hypothesis testing. R package version 1.18.0). Pearson's chi-squared test was used for clinical variables. Pathways were identified using global test (Goeman JJ, van de Geer SA, de Kort F, van Houwelingen HC 2004. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics* 20: 93-99). P-values are corrected for multiplicity using Benjamini-Hochberg method to control false discovery rate or with the Bonferroni method to control family wise error rate. Survival curves are obtained through Kaplan-Meier estimates and the difference between two curves is assessed by log rank test. Finally, a heatmap is generated to highlight the relationships between clustering and protein expression level. Remarkably, by unsupervised hierarchical clustering a strong phosphorylation/activity of most of the sampled members of the PI3K/Akt/mTOR pathway was observed in 70% of samples from AML patients. This confirms that this pathway might indeed represent a pharmacological target in many patients.

Moreover, treatment with the above inhibitors had no effect on the phosphorylation of other selected targets, demonstrating the specificity of

the above results (more than one different inhibitor was used to avoid off-target effects). More importantly, by the use of the above drugs, we have been able to discriminate within the "high pAkt" population a PI3K/Akt/mTOR inhibitor-responsive group of patients and a PI3K/Akt/mTOR inhibitor non-responsive group. In addition, our data indicate that the Akt pathway is hyper-activated in M4, M5 patients, compared to M0, M2 patients, and that a strong activation of most upstream and downstream Akt effectors correlates with an over-expression of the c-kit receptor (CD117). The data obtained with RPPA were confirmed by both western blotting and flow cytometry analysis. We believe these data are important because they have the potential to define a profile for the personalized administration of targeted drugs.

# **INTRODUZIONE**



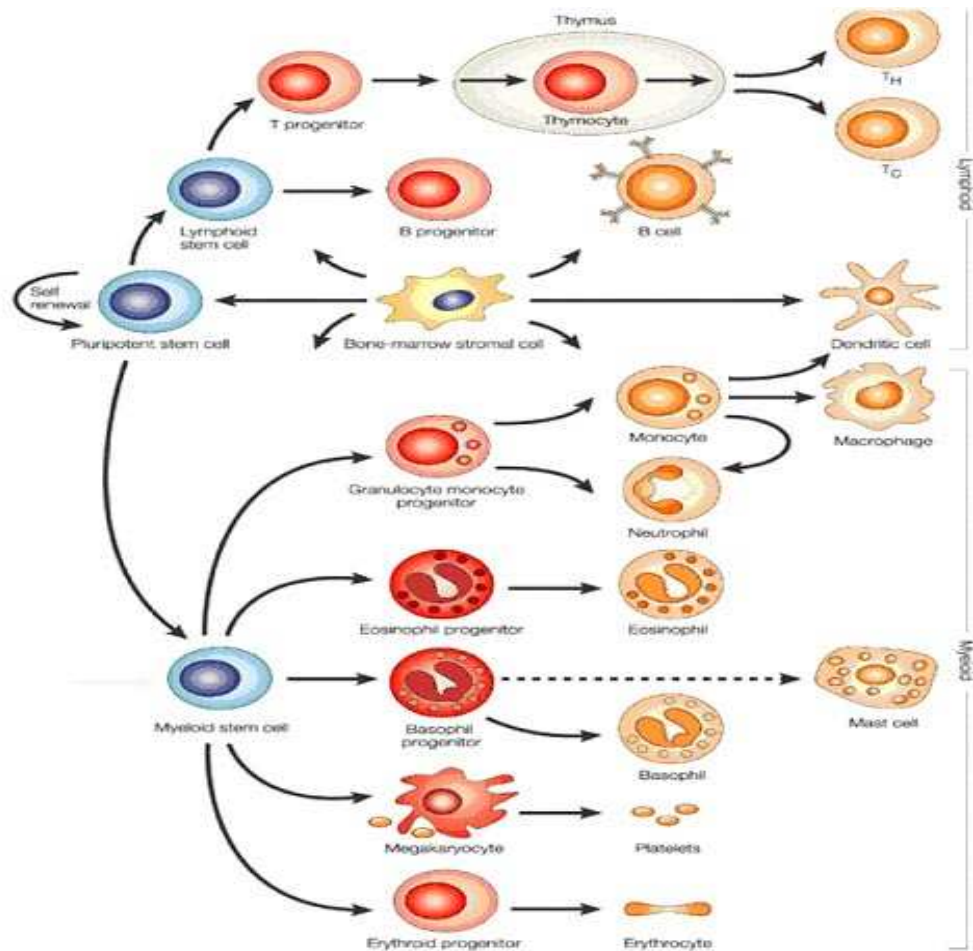
## **2.1 La leucemia mieloide acuta (LAM)**

La leucemia mieloide acuta (LAM) è il tipo di leucemia più comune negli adulti e più frequente negli anziani con età superiore ai 60 anni.

Si definisce LAM un gruppo eterogeneo di malattie clonali caratterizzato dal blocco dei normali processi di differenziamento ed ematopoiesi che porta alla crescita smisurata di una popolazione clonale di cellule neoplastiche dette blasti.

Per poter parlare di leucemia mieloide acuta è necessario che nel midollo come nel sangue periferico sia presente una quantità di cellule blastiche superiore al 20%.

L'eterogeneità della patologia deriva dal fatto che le trasformazioni leucemiche possono verificarsi a stadi diversi nel percorso di differenziazione cellulare che coinvolge i precursori della linea mieloide (FIG. 1).



**FIG 1: EMOPOIESI:** La cellula staminale pluripotente può seguire linee di maturazione morfologicamente e funzionalmente diverse, a seconda del condizionamento determinato dal tipo di stimolo o di mediatore presente. Questa procede verso due direzioni principali: la **linea linfoide** da cui si avvia la linfopoiesi (linfociti B, T ed NK ), la **linea mieloide** da cui si sviluppano la mielopoiesi, l'eritropoiesi e la produzione di piastrine (granulociti, monociti, eritrociti, piastrine).

Questa alterazione maligna delle cellule staminali ematopoietiche, se non trattata, porta alla morte in un lasso di tempo che va da poche settimane ad alcuni mesi dall'esordio della malattia [Joshua et al. 2009].

Si possono identificare tre diversi tipi di leucemie mieloidi, quelle primarie o “de novo” ad insorgenza primitiva, quelle secondarie ad una sindrome mielodisplastica e quelle secondarie derivate dall'esposizione a sostanze tossiche e/o a precedenti chemioterapie.

Come per la leucemia linfoblastica acuta (LLA) la diagnosi di LAM viene eseguita il più delle volte a partire da un aspirato midollare. Questo test viene effettuato in parte come conferma della diagnosi e in parte per consentire importanti esami supplementari volti a stabilire il tipo esatto di LMA.

### **2.1.1 Classificazione**

La caratterizzazione di una leucemia acuta mieloide avviene innanzitutto utilizzando tecniche di citochimica e di immunologia, questa prima fase è seguita dalla caratterizzazione citogenetica e molecolare. Colorazioni specifiche identificano il tipo di cellula, questa prima informazione viene integrata successivamente da quella relativa all'immunofenotipo. Con l'applicazione di un ampio pannello di anticorpi monoclonali specifici diretti contro antigeni presenti sulla superficie dei blasti, è possibile infatti,

identificare le caratteristiche peculiari indispensabili per la diagnosi della malattia.

La LAM e' stata tradizionalmente classificata dal sistema FAB (dalle iniziali delle parole French-American-British indicative del gruppo di ematologi che hanno progettato tale sistema di classificazione basato sull'osservazione al microscopio ottico delle cellule leucemiche) in 8 sottotipi (da M0 a M7).

Ogni classe di LAM prende il nome dal tipo di cellula immatura che la caratterizza. In alcuni casi si ha un'unica cellula immatura, in altri questa cellula va incontro ad un minimo di maturazione, però, senza mai arrivare alla maturazione completa.

La classificazione morfologica avviene evidenziando alcuni markers, attività enzimatiche (MIELOPEROSSIDASI (MPO), ESTERASI ASPECIFICA (NSE)) e particolari elementi morfologici eventualmente presenti (CORPI DI AUER).

L'attività mieloperossidasi evidenzia gli elementi maturi della serie mieloide, M1.M2, M3 e M4 (M0, M5 ed M7 sono negative per la MPO), l'attività dell'esterasi aspecifica e' positiva nelle forme M3, M4 ed M5 mentre i corpi di Auer sono presenti,in quantita' crescenti, nelle sottoclassi M1, M2 e M3.

### **LAM-M0: leucemia mieloblastica scarsamente differenziata**

La forma più indifferenziata prende il nome dalla cellula più immatura della serie mieloide, il mieloblasto. E' una leucemia piuttosto rara con due caratteristiche importanti: più del 30% delle cellule del midollo sono mieloblasti ed è negativa per la MPO.

### **LAM-M1: leucemia mieloblastica acuta senza maturazione.**

Questa forma è molto più frequente rispetto alla prima, che era costituita esclusivamente da elementi indifferenziati. L'elemento cellulare in questione è sempre il mieloblasto che presenta un minimo grado di maturazione. A livello midollare sono presenti più del 30% di mieloblasti e meno del 10% di promielociti e qualche neutrofilo. Più del 3% delle cellule presenta positività alla MPO.

### **LAM-M2: leucemia mieloide acuta con maturazione.**

E' una leucemia mieloblastica. A differenza delle due precedenti, presenta un certo grado di maturazione. Più del 10% delle cellule midollari sono promielociti o neutrofili, ciò significa che sono maturate da mieloblasto fino ad arrivare a promielocita, mielocita ed anche neutrofilo. Per definizione, essendo questa una leucemia mieloblastica, ci sono più del 30% di mieloblasti a livello midollare. Nel 10% delle cellule si riscontra attività positiva della mieloperossidasi.

### **LAM-M3: leucemia promielocitica acuta**

In questa forma sono presenti elementi immaturi della serie mieloide ed elementi un po' più maturi della serie promielocitica, che risultano essere predominanti rispetto ai primi. I corpi di Auer sono particolarmente frequenti in questa forma di leucemia. E' la forma più caratterizzata molecolarmente e per la quale notevoli progressi nel campo della terapia sono stati fatti. Infatti è noto che si associa ad una tipica traslocazione cromosomica t(15;17) e ad una mutazione molecolare detta PML/RAR alfa. Per tale mutazione questo tipo di leucemia risponde ad un terapia con acido all-trans-retinoico, che porta a maturazione i promielociti leucemici impedendone la maturazione.

### **LAM-M4: leucemia mielomonocitica acuta.**

Nelle forme M0, M1 ed M2 sono presenti essenzialmente mieloblasti, nella M3 i promielociti predominano rispetto ai mieloblasti e nella M4, oltre a mieloblasti e promielociti, più del 20% delle cellule è rappresentato da cellule della serie monocitoide (serie monocitico-macrofagica). Il midollo osseo è caratterizzato ancora dalla presenza di elementi immaturi (mieloblasti) accompagnati da un aumento delle cellule della serie mielomonocitica, immature (monoblasti e promonociti) e mature (monociti). Come la forma di leucemia M3 è caratterizzata dalla presenza

dei corpi di Auer, la M4 lo è per la positività alle esterasi aspecifiche (NSE).

La LAM-M4Eo è un sottogruppo all'interno di questa LAM in cui si riscontra un notevole aumento a livello midollare di eosinofili, ciò conduce ad una prognosi migliore rispetto alla forma M4.

### **LAM-M5: leucemia monocitica acuta**

E' una leucemia nella quale predominano le cellule di tipo monocitario. Mentre nelle M0, M1, M2 ed M3 predominavano le cellule mieloidi, nella M4 mieloidi e monocitarie, nella M5 sono le cellule di tipo monocitoide che la fanno da padrone. Esistono due varianti di questa LAM:

*LAM-M5A leucemia monoblastica acuta:* le cellule della serie monocitoide sono rappresentate per maggior parte da monoblasti;

*LAM-M5B leucemia monocitica acuta:* le cellule monocitoidi presenti sono soprattutto monociti, quindi più mature.

La LAM-M5 è la forma che più frequentemente si localizza a livello dei linfonodi e dei tessuti, soprattutto, la cute. La positività per la NSE (esterasi aspecifica) non è diagnostica come , invece lo è, quella per il marker specifico per i monociti-macrofagi, il CD68.

### **LAM-M6: eritroleucemia acuta.**

La M6 è una leucemia che riguarda essenzialmente i precursori eritroidi, di qui il nome di eritroleucemia. Più del 50% delle cellule del midollo è costituito da elementi immaturi della serie eritroide. Tipicamente colpisce soggetti in età avanzata ed è associata a terapia.

### **LAM-M7: leucemia megacariocitica acuta.**

E' una leucemia che interessa in modo particolare la serie megacariocitaria, quindi almeno il 30% delle cellule del midollo sono elementi blastici della serie megacariocitaria.

Nel 2001 l'organizzazione mondiale della sanità (WHO) ha pubblicato una nuova classificazione per le LMA che considera una serie di valutazioni morfologiche, immunofenotipiche e citogenetiche che sono eseguite sul materiale ottenuto mediante aspirato midollare.

Le leucemie acute mieloidi sono perciò suddivise in 4 sottogruppi:

- 1) LAM con anomalie citogenetiche ricorrenti;**
- 2) LAM con displasia multilineare;**
- 3) LAM secondarie a precedenti trattamenti chemioterapici e radioterapici;**
- 4) LAM non classificabili.**
- 5) leucemie di lineage ambiguo.**



LAM con anomalie genetiche ricorrenti	LAM con t(8;21)(q22;q22); (AML1 [CBFA]/ETO)	
	LAM con anomalie eosinofile midollari con	inv(16)(p13q22)
		t(16;16)(p13;q22) (CBFB/MYH11)
	LAP = LAM t(15;17)(q22;q12) (PML/RARA) e relative varianti	
	LAM con anomalie 11q23 (MLL)	
LAM con displasia multipla (de novo o secondarie a MDS specie AREB o AREBt)		
LAM, correlate alla terapia	da agenti alchilanti.	
	da inibitori della topoisomerasi II	
LAM di derivazione ambigua	LAM indifferenziata	
	LA bilineare (presenza contemporanea di più cloni trasformati)	
	LA bifenotipica (singola popolazione di cellule leucemiche con simultanea espressione di differenti origine emopoietica)	
LAM non altrimenti caratterizzata	LAM con minima differenziazione (FAB M0)	
	LAM senza maturazione (FAB M1)	
	LAM con maturazione (FAB M2)	
	AMML (FAB M4)	
	FAB M5a and M5b	
	LAM eritrocitaria (FAB M6)	Eritroleucemia (FAB M6a)
		Leucemia Eritroide Pura (FAB M6b)
	Leucemia Acuta Megacariocitica (FAB M7)	
	Leucemia Acuta Basofila	
	Panmielosi acuta con mielofibrosi	
	Sarcoma mieloide (granulocitico)	

**TABELLA 1 : classificazione WHO dei sottotipi di Leucemia Mieloide Acuta.**

La WHO ha deciso di rivedere la classificazione delle malattie mieloidi perché oggi si sa che alcune condizioni sono correlate con alterazioni genetiche ben specifiche tali da essere considerate entità patologiche autonome. In modo particolare, questo è vero per alcune leucemie mieloidi acute. Quasi tutte le LAM sono associate con alterazione genetiche, alcune di queste in modo specifico.

### **2.1.2 Diagnosi**

La **diagnosi** si sospetta in base al quadro clinico e si conferma con le indagini di laboratorio. Gli esami di laboratorio rilevano delle anomalie a livello dell'emocromo ed un esame morfologico del sangue periferico può essere risolutivo. A questo segue generalmente un esame del midollo osseo con la caratterizzazione biologica del tipo di leucemia (morfologia, immunologia, citogenetica, biologiamolecolare). Le alterazioni biologiche a livello citogenetico e molecolare possono essere di aiuto una volta ottenuta una remissione completa, per la valutazione della malattia minima residua, cioè della quota residua di malattia ancora presente dopo la chemioterapia.

### **2.1.3 Analisi citogenetiche e rischio**

In circa il 45% dei soggetti affetti da LAM è presente un cariotipo alterato, con aberrazioni cromosomiche ricorrenti, e circa il 15% presenta 3 o più anomalie e quindi un cariotipo di tipo complesso.

L'analisi citogenetica rimane un indicatore prognostico di estrema importanza e definisce tre gruppi di rischio generali: favorevole, intermedio e sfavorevole.

Il gruppo di rischio favorevole include la leucemia promielocitica acuta che, nella maggiorparte dei casi, è associata alla traslocazione t(15;17) ed è l'unico tipo di AML trattato con una terapia specifica (Acido Trans-Retinoico).

Le LAM con traslocazione t(8;21) o inversione inv(16) t(16;16) tendono ad essere associate ad una categoria di rischio favorevole, del resto vengono trattate con gli stessi agenti in uso per tutti gli altri sottotipi di LAM (citarabina e doxorubicina) e nonostante si parli di rischio "favorevole" la metà dei pazienti ancora muore per questa malattia, i risultati peggiori sono quelli ottenuti sui pazienti anziani.

Casi caratterizzati dalla traslocazione t(9,11) sono associati ad un rischio intermedio, come i casi in cui si ha la perdita di interi cromosomi e più in particolare del cromosoma Y.

Il gruppo con categoria di rischio sfavorevole include la traslocazione t(6;9), l'inversione inv(3)/t(3;3) e in generale tutti i cariotipi complessi.

Casi con alterazioni multiple sono solitamente osservati nei pazienti più anziani con una prognosi assolutamente sfavorevole.

Ciò che fino ad oggi è risultato particolarmente difficoltoso è stato classificare le LAM con citogenetica normale, che rappresentano il 40% di tutte le leucemie mieloidi acute.

In questi casi il fattore di rischio viene considerato “intermedio”, lo sviluppo individuale della malattia varia in maniera considerevole, ed è in parte correlato con specifiche anomalie molecolari [Bryan L et al. 2010].

#### **2.1.4 Alterazioni molecolari nella LAM**

Durante gli ultimi dieci anni è stata scoperta una serie di mutazioni nucleotidiche, non rilevabili mediante analisi citogenetiche standard, in una lista crescente di geni. Tali mutazioni sono quindi diventate, allo stesso modo delle alterazioni citogenetiche, dei veri e propri marker prognostici.

L'importanza della scoperta di queste mutazioni geniche sta nell'aver fornito importanti informazioni per determinare la prognosi di quei pazienti LAM con cariotipo normale (NC LAM).

Ad oggi un largo numero di mutazioni è stato identificato nelle NC LAM, quelle più significative da un punto di vista prognostico sono relative a NPM1 (Nucleophosmin), CEBPA (CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ ) ed FLT3-ITD (FMS related tyrosin kinase 3).

NPM1 è una fosfoproteina polifunzionale che si muove tra i compartimenti nucleare e citoplasmatico. Nel suo stato normale è prevalentemente localizzata nel nucleo, dove è implicata nell'assemblaggio dei ribosomi e nella regolazione di ARF e del "tumor suppressor" p53. Le mutazioni di NPM1 solitamente associate alla LAM portano ad una localizzazione citoplasmatica della proteina e sono indice di una prognosi favorevole e di una buona risposta alla farmacoterapia.

CEBPA è un fattore di trascrizione la cui funzione è cruciale per lo sviluppo e il differenziamento dei granulociti dai precursori ematopoietici. La mutazione di CEBPA associata alla LAM è stata in un primo momento messa in relazione con , si pensava promuovesse la leucemogenesi bloccando il differenziamento dei granulociti, al contrario recentemente è stata correlata ad un aumento della sopravvivenza e quindi ad una prognosi favorevole.

FLT3 è un recettore tirosin chinasi ancorato alla membrana plasmatica che, una volta attivato dal suo ligando, sostiene il *survival* e la proliferazione dei progenitori ematopoietici. Una duplicazione tandem interna al gene FLT3 è associata ad una prognosi molto sfavorevole e all'aumento delle probabilità di ricaduta.

### **2.1.5 Alterazioni della trasduzione del segnale nella LAM**

Molti dei pazienti LAM sottoposti ad una chemioterapia aggressiva raggiungono la completa remissione. Tuttavia la frequenza delle ricadute è molto alta, e il tasso di sopravvivenza relativo al quinto anno di decorso della malattia è solo del 20% [Rowe JM et al. 2008].

Per questo motivo grandi sforzi sono stati fatti per riuscire a sviluppare nuovi e più efficaci trattamenti per i pazienti affetti da questa patologia.

Come è già stato specificato, la LAM è caratterizzata da un aumento incontrollato della proliferazione e del *survival* dei progenitori mieloidi immaturi nel corso dell'emopoiesi. Questo aumento è associato ad una deregolazione delle principali vie di trasduzione del segnale che talvolta risultano attivate in maniera aberrante.

In particolare, numerose pubblicazioni hanno evidenziato l'anomalo stato di attivazione di PI3K/Akt, mTORC1, ERK/MAPK, STAT3/5, Wnt/ $\beta$ -Catenina, NF- $\kappa$ B nella leucemia mieloide acuta [Wu J et al. 2004, Petropoulos K et al. 2008], ed è stato ipotizzato che proprio questi pathways possano fungere da target terapeutici.

### **2.1.6 Ruolo della via di segnale PI3K/Akt/mTOR nella LAM**

L'iperattivazione della protein chinasi Akt è un evento comune al 50-80% dei pazienti LAM [Xu Q et al 2003, Gallay N et al 2009]

Laddove questa iperattivazione si verifica, è associata ad una bassa probabilità di remissione dalla malattia e ad un altrettanto basso tasso di sopravvivenza [Min YH et al 2004, Kornblau SM et al 2006, Kornblau SM et al 2009]. Solitamente la prognosi sfavorevole associata a pazienti con l'asse PI3K/Akt/mTOR iperattivo è correlata al controllo esercitato da questo pathway sull'espressione dell' *ATPbinding cassette(ABC) transporter, multidrug resistance-associated protein 1*, la cui funzione è quella di espellere i chemioterapici dalle cellule leucemiche e che è quindi associata ad una riduzione della sopravvivenza [Tazzari PL et al. 2007, Schaich M et al. 2005].

Ultimamente si è ipotizzato che l'attivazione costitutiva di PI3K/Akt/mTOR possa in realtà essere un fattore prognostico positivo in esordi di LAM, poiché questa iperattivazione potrebbe guidare i precursori mieloidi immaturi in fase S, rendendoli più suscettibili alla polichemioterapia [Tamburini J et al. 2007].

La causa della up-regolazione di questa via di segnale nella LAM è il risultato di una serie di fattori, che includono le mutazioni del recettore tirosin chinasi FLT3 [Muranyi AL et al. 2009], del recettore tirosin chinasi c-kit [Faderl S et al. 2009], di N- o K-Ras [Birkenkamp KU et al.

2004], l' overespressione delle subunità p110 $\beta$  o  $\delta$  della PI3K [Sujobert P et al. 2005, Doepfner KT et al. 2007], i bassi livelli di PP2A [Gallay N et al. 2009], e le secrezioni autocrine e paracrine di fattori di crescita come l'IGF-1 [Doepfner KT et al. 2007, Wahner Hendrickson AE et al. 2009] e il VEGF [Imai N et al. 2009, Bohm A et al. 2009].

In un gruppo di 66 pazienti LAM, l'overespressione di PDK1 è stata rilevata nel 45% dei casi, ed è stata correlata ad una iperfosforilazione di PKC; mentre la relazione con la T308 di Akt non è stata analizzata [Pearn L et al. 2007].

L'attivazione di PI3K/Akt/mTOR sembra correlata anche all'interazione tra le cellule leucemiche e quelle stromali del midollo osseo attraverso il recettore CXCR4 e il suo ligando CXCL12, prodotto nelle cellule dello stroma [Fiegl M et al. 2009, Ayala F et al. 2009]. CXCR4 è un recettore GPC, abbondantemente espresso sulla superficie delle cellule leucemiche e up-regolato in condizioni di ipossia [Fierro FA et al., Fiegl M et al. 2009].

L'interazione tra l'integrina  $\beta$ 1 e la fibronectina stromale, nelle LAM, può ulteriormente portare all'attivazione del suddetto pathway [Matsunaga T et al. 2003, Matsunaga T et al. 2008] probabilmente attraverso l'up-regolazione della chinasi ILK1 (Integrin linked kinase 1), la quale è anche coinvolta nella fosforilazione PI3K dipendente di Akt sulla S473 [Tabe Y et al. 2007].



La capacità di ILK1 di fosforilare la S473 di Akt potrebbe essere correlata al fatto che essa interagisce con Rictor ed è necessaria affinché lo stesso complesso mTORC2 fosforili la S473 [McDonald PC e al. 2008].

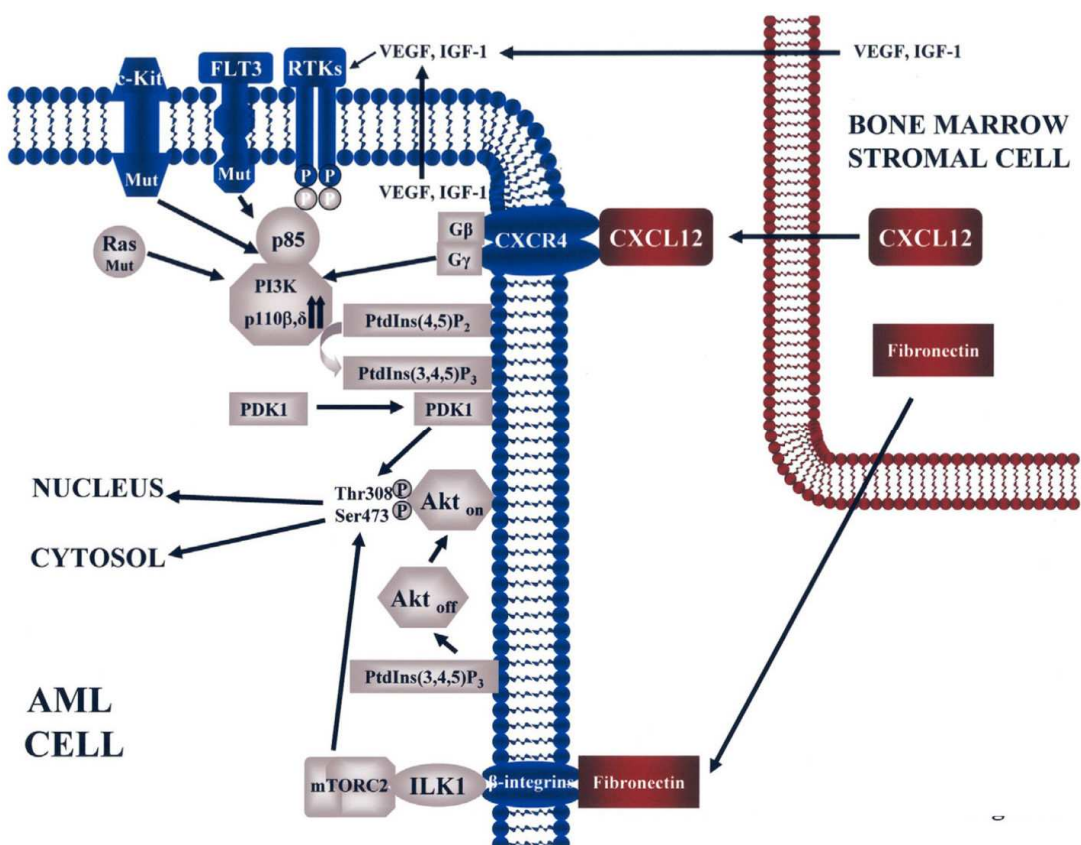
Non sono state trovate mutazioni attivanti nel dominio p110 $\alpha$  della PI3K [Bousquet M et al. 2005] né nel dominio PH di Akt1 [Tibes R et al. 2008].

Nonostante la delezione di PTEN sia una caratteristica di molti tumori solidi, nonché delle cellule T della leucemia linfoblastica acuta, essa è estremamente rara nella LAM [Xu Q et al. 2003, Grandage VL et al. 2005, Gallay N et al. 2009].

PTEN può d'altro canto essere inattivato da meccanismi post traduzionali, che includono la fosforilazione del suo dominio regolatorio alla estremità COOH terminale. Tale fosforilazione stabilizza PTEN e lo rende meno attivo nei confronti del PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, determinando una up-regolazione di Akt [Vazquez F et al. 2000].

Oggi queste scoperte riguardanti il ruolo di PTEN nella LAM non sono state del resto confermate, sicchè questa fosfatasi continua ad essere oggetto di studi approfonditi.

Ciò che emerge chiaramente è che cause concomitanti intrinseche ed estrinseche convergono nel determinare l'attivazione di PI3K/Akt/mTOR nei pazienti LAM e che questa via di segnale sembra essere quindi un target terapeutico fondamentale per la cura di questa patologia (FIG. 2).



**FIG. 2: Attivazione costitutiva di PI3K/Akt nelle LAM.** La mutazione di c-Kit, FLT3 o Ras e la secrezione autocrina/paracrina di fattori di crescita (VEGF, IGF1) determina un aumento di PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> a livello della membrana plasmatica. Questo evento determina l'attivazione di Akt a seguito del suo reclutamento in membrana, dove viene fosforilato da PDK1 sulla T308 e dal complesso mTORK2 sulla S473. Le cellule stromali del midollo osseo secernono CXCL12 e fibronectina, quest'ultima attivando ILK1 incrementa la fosforilazione di Akt sulla S473; CXCL12 lega il suo recettore CXCL4 e determina un aumento nell'attivazione di PI3K. Le cellule stromali possono inoltre secernere VEGF e IGF1. Una volta attivato Akt migra verso il nucleo e verso il citosol per fosforilare i suoi substrati. (Martelli A et al, Oncotarget. 2010 June ; 1(2): 89–103).

## 2.2 La Famiglia delle Fosfoinositide 3-chinasi: PI3K

La famiglia delle fosfoinositide 3-chinasi è suddivisa in quattro classi, a seconda della struttura caratteristica e dei bersagli degli enzimi che ne fanno parte; le prime tre classi si occupano della fosforilazione di lipidi (FIG. 3), mentre la quarta fosforila proteine (mTOR, ATM, ATR e DNA-PK) [Amancio C 2010].

La classe I è sicuramente quella fino ad oggi più studiata e quindi quella maggiormente caratterizzata, probabilmente per il ruolo che ricopre nei processi di traduzione del segnale all'interno della cellula.

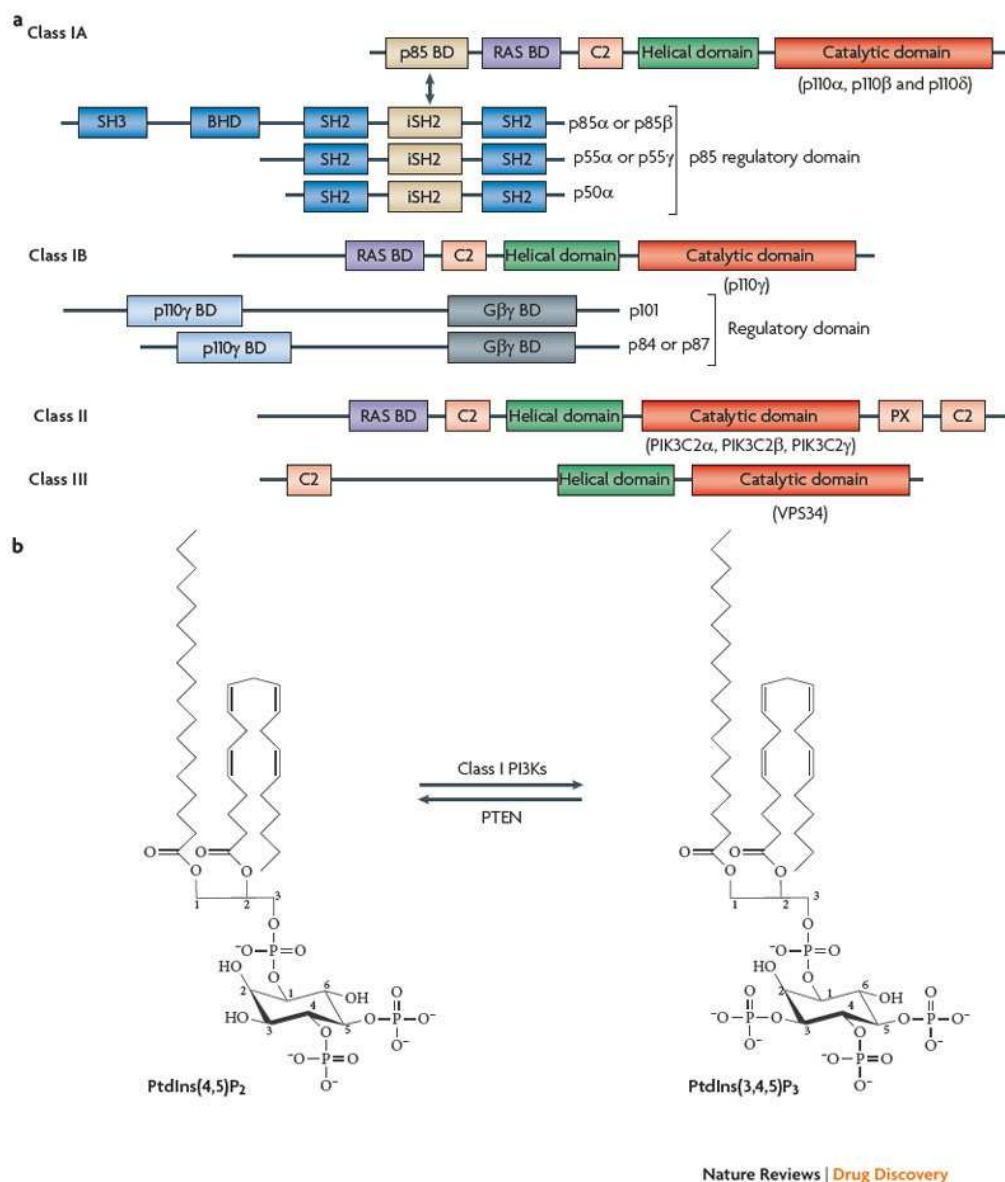
Le fosfoinositide 3-chinasi di classe I sono chinasi eterodimeriche costituite da una subunità regolatoria e da una subunità catalitica (p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ ), si occupano del trasferimento di un gruppo  $\gamma$ -fosforico dell'ATP sulla posizione D<sub>3</sub> del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) il quale, recluta a livello della membrana plasmatica proteine contenenti un dominio PH (Pleckstrin Homology).

La classe I può a sua volta essere suddivisa in due ulteriori classi, la **Ia** e la **Ib**.

La classe **Ia** è composta da PI3K costituite dalla combinazione di una subunità regolatoria (p85, p65 o p55) e di una subunità catalitica del peso di 110kDa, p110 $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ . Queste PI3K vengono attivate da recettori tirosin-chinasici (RTK).

In condizioni di riposo le PI3K di classe Ia sono localizzate nel citoplasma, una volta attivato un recettore RTK grazie al suo specifico ligando, esso dimerizza e si autofosforila in *trans* sui residui di tirosina esposti sulle porzioni citoplasmatiche del dimero. I domini SH2 della p85 si legano, quindi, ai residui di fosfotirosina dei recettori RTK e questo legame provoca un cambiamento conformazionale della PI3K, in grado a questo punto di interagire con il suo substrato lipidico.

La classe **Ib** è composta da PI3K che hanno come subunità regolatoria la p101 e come subunità catalitica la p110  $\gamma$ , la loro attivazione è mediata da recettori associati a proteine G eterodimeriche.



**FIG. 3: La famiglia delle Fosfoinositide 3 chinasi PI3K. a) PI3K classi I, II e III. b) Attività chinastica delle PI3K di classe I sul PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.**

### **2.2.1 La Protein chinasi AKT**

La scoperta della Serina /Treonina chinasi Akt si deve alla sua analogia con il prodotto dell'oncogene v-Akt isolato dal reovirus AKT8. Questa proteina viene solitamente indicata anche con il nome RAC (Related to A and C kinases) e PKB, per l'omologia del suo dominio catalitico con quello della PKA e della PKC.

Esistono tre isoforme di Akt: Akt1, Akt2 e Akt3 [Manning B et al. 2007] (FIG. 3), Akt1 è espresso in maniera ubiquitaria, Akt2 è predominantemente espresso in quei tessuti soggetti all'azione dell'insulina, come il tessuto adiposo, il fegato e il muscolo scheletrico, Akt3 è maggiormente espresso nel cervello [Yang ZZ et al. 2003, Hodgkinson CP et al. 2003]. La famiglia di chinasi Akt è altamente conservata tra gli eucarioti, con una identità di sequenza aminoacidica del 95% tra le specie umana, ratto e topo; è una proteina di 57 kDa, citosolica e altamente solubile caratterizzata dalla presenza di tre domini conservati in ciascuna isoforma: un dominio PH N-terminale (pleckstrin homology), un dominio chinasi centrale ed un dominio regolatorio C-terminale.

Il dominio PH, con i suoi circa 100 amminoacidi, è per l'80% identico in tutte e tre le isoforme e lega con alta affinità il fosfatidilinositolo 3, 4, 5 trisfosfato [PtdIn(3,4,5)P3] e il fosfatidilinositolo 3, 4, bisfosfato [PtdIn(3,4)P2] mentre è praticamente incapace di legare fosfoinositidi che non hanno un fosfato in posizione D3 e D4.

Il dominio chinasi di Akt consta di circa 250 amminoacidi ed è molto simile a quello della PKC, della PKA, di SGK (protein chinasi indotta dai glucocorticoidi e dal siero) ed in generale a quello di tutte le protein chinasi appartenenti alla famiglia AGC; esso contiene una treonina, conservata nelle tre isoforme, la cui fosforilazione è necessaria per la completa attivazione di Akt; la treonina in questione (Thr308 in Akt1, Thr 309 in Akt2 e Thr 305 in Akt3) è collocata nel cosiddetto “activation loop” della chinasi. Il dominio C-terminale, con i suoi circa 40 amminoacidi, contiene il caratteristico motivo idrofobico delle AGC chinasi: FX-X-F/Y-S/T-Y/F, dove X è un amminoacido qualsiasi.

Per la completa attivazione di Akt, in tutte e tre le sue isoforme, è necessario che venga fosforilata una serina conservata presente in questa regione [Manning B et al. 2007, Fayard E et al. 2005, Thomas CC et al. 2002]

### **2.2.2 Attivazione di Akt**

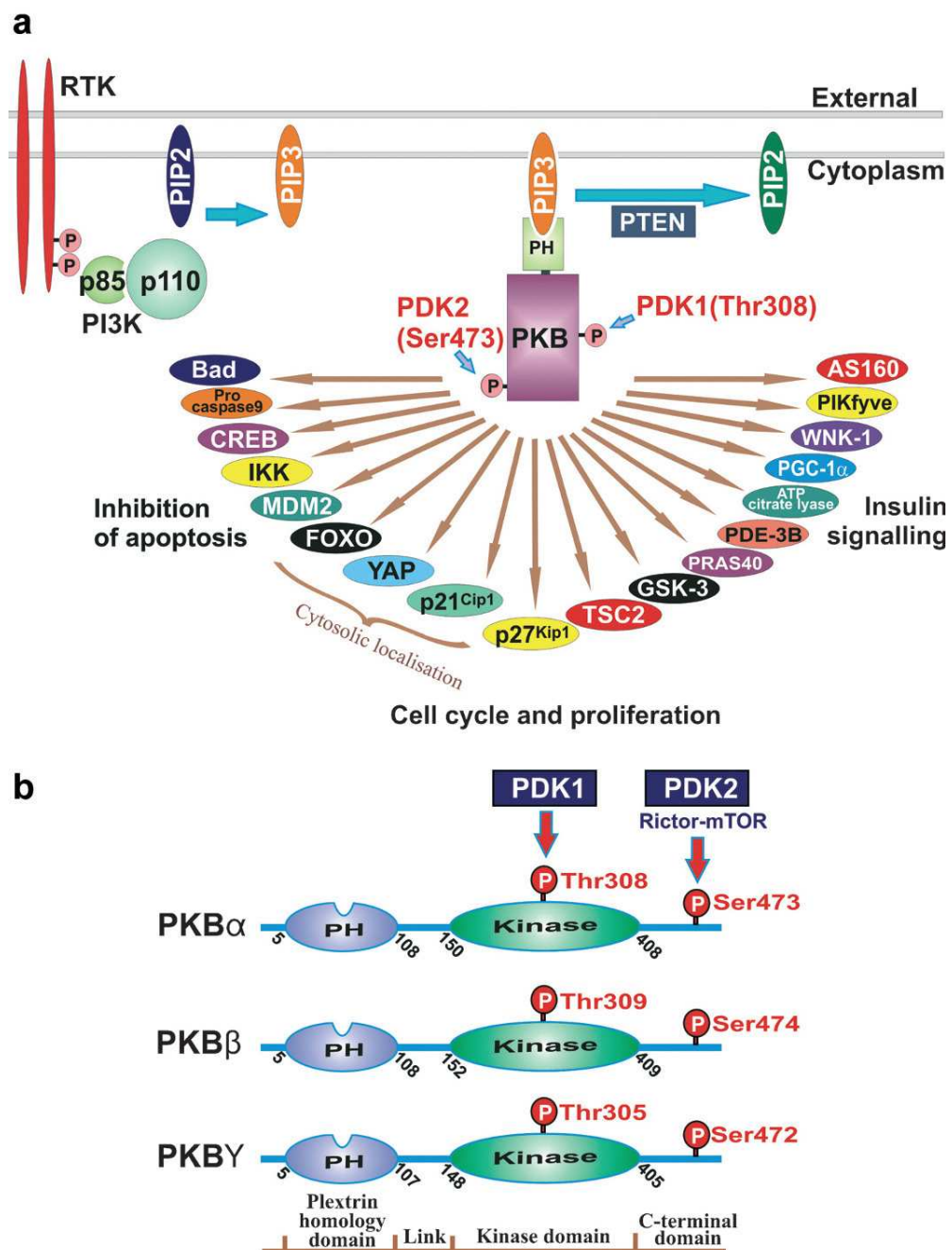
La Fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K), regolatore chiave di molti processi di fondamentale importanza per la cellula, promuove la fosforilazione di una serie di protein chinasi tra le quali vi è anche Akt. Sia PI3K che Akt sono attivate da numerosi fattori di crescita e dall'insulina.

PI3K determina la formazione del secondo messaggero chiave PtdIn(3,4,5)P3 a livello della membrana plasmatica, il quale lega il dominio

PH di Akt provocando la sua traslocazione in membrana. L'interazione tra Akt e PtdIn(3,4,5)P3 non attiva direttamente Akt ma induce un cambiamento conformazionale della sua struttura che facilita la sua fosforilazione su T308 e su S473 da parte delle chinasi fosfoinositide dipendenti PDK1 e 2, rispettivamente [Manning B et al. 2007, Fayard E et al. 2005, Thomas CC et al. 2002]. La fosforilazione della T308 e della S473 è condizione necessaria e sufficiente affinché si abbia una completa attivazione di Akt, laddove al contrario la fosforilazione su un unico sito attiva questa chinasi solo parzialmente [Manning B et al. 2007]. Si pensa che la fosforilazione sulla S473 sia il passo cruciale nell'attivazione di Akt per la sua capacità di stabilizzare il dominio chinasi in uno stato conformazionale attivo [Hanada M et al. 2004]. Una volta attivato, Akt si dissocia dalla membrana plasmatica e fosforila molti substrati nel citoplasma e nel nucleo. Caratteristica della maggior parte dei substrati di Akt è la sequenza consenso RXRXX(S/T) [Fayard E et al. 2005]. PDK1, come Akt ha un dominio PH che consente il legame di questa chinasi al PtdIn(3,4,5)P3 [Manning B et al. 2007, Fayard E et al. 2005, Thomas CC et al. 2002]. PDK1 è la chinasi che fosforila Akt sulla T308. Molto più difficoltoso è stato riuscire a capire quale fosse l'identità della chinasi che fosforila la S473, ad oggi una serie di evidenze ha dimostrato che mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) è la PDK2 fisiologica [Sarbasov D et al. 2005, Shiota C et al. 2006].



mTORC2, è un complesso costituito dalla chinasi mTOR, da mLST8, *mammalian stress-activated protein kinase* (SAPK)- *interacting protein* (mSin1) e rictor (rapamycin in sensitive companion of mTOR).



**FIG. 3:** **a)** I substrati di PKB. **b)** Struttura delle tre isoforme di PKB:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . (Sale EM and Sale GJ, Cell. Mol. Life Sci. 65 (2008) 113 – 127).

### 2.2.3 mTOR

La Serina Treonina/chinasi mTOR appartiene alla famiglia di chinasi correlate a PI3K, il suo sito catalitico mostra un'altissima omologia con quello di questa chinasi e il suo peso molecolare è all'incirca di 289kDa.

Si associa con una serie di altre proteine a formare due complessi, *mTOR complex 1* (mTORC1) ed *mTORC complex 2* (mTORC2) (FIG.4).

mTORC1 comprende mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40, FKBP38, Deptor ed è sensibile alla rapamicina e ai suoi derivati, mTORC2 comprende mTOR, Rictor, mLST8, SIN1, Protor, Deptor ed è descritto come insensibile alla rapamicina.

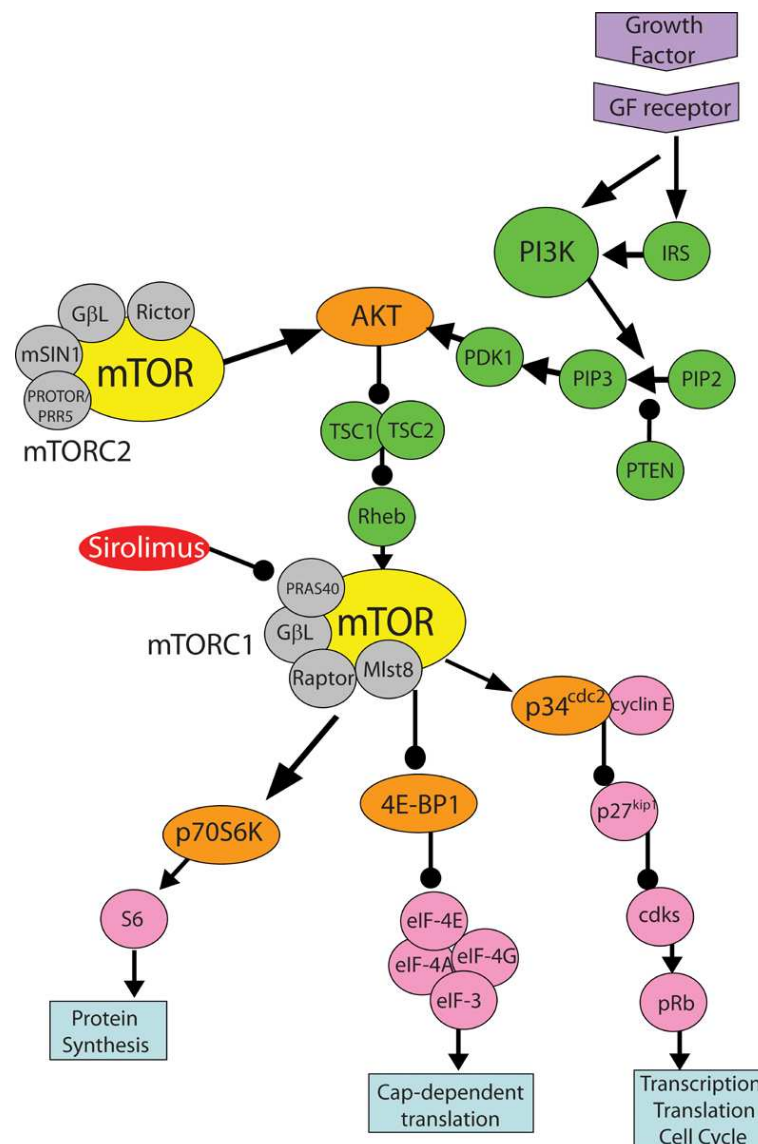
mTORC1 integra segnali provenienti dall'ambiente esterno come fattori di crescita, ormoni, nutrienti, stress con informazioni relative allo status metabolico della cellula, e controlla quindi i processi anabolici per promuovere la sintesi proteica e la crescita cellulare [Tamburini J et al. 2009].

mTORC1 regola la traduzione in risposta a nutrienti e fattori di crescita fosforilando componenti della “macchina” per la sintesi proteica che includono la p70S6K e 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1). p70S6K fosforila la proteina ribosomiale 40S, S6, e ciò determina l'attivazione della traduzione dell' mRNA, mentre la fosforilazione di 4E-BP1 da parte di mTORC1 su diversi siti determina il rilascio di eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E). eIF4E è un componente

chiave per la traduzione di trascritti che codificano per promotori della crescita cellulare come c-myc, la ciclica D1, cdk2, la proteina del retinoblastoma, p21Kip1, VEGF (vascular endothelial growth factor), STAT3 (signal activator and transducer of transcription 3) [Dunlop EA et al. 2009, Mamane Y et al. 2006]. Inoltre mTORC1 regola negativamente l'autofagia, un tipo di morte cellulare non apoptotica, che è oggi molto studiata per la sua capacità di influenzare la sensibilità delle cellule tumorali ai trattamenti farmacologici [Crazzolara R et al. 2006].

I meccanismi relativi alla regolazione di mTORC2 sono tuttora non perfettamente conosciuti. L'attivazione di mTORC2 è dipendente dalla PI3K e dal complesso TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis 1 e 2); una volta attivata essa fosforila Akt sulla S473 e in questo modo stimola PDK1 a fosforilare Akt sulla T308 [Sarbasov DD et al. 2005]. mTORC2 gioca un ruolo importante nell'organizzazione del citoscheletro, controlla infatti la polimerizzazione dell'actina [Jacinto E et al. 2004], fosforila inoltre la protein chinasi C  $\alpha$  (PKC  $\alpha$ ) [Huang J et al. 2009], e la protein chinasi indotta dai glucocorticoidi 1 (GSK1) [Garcia-Martinez JM et al. 2008]. Il ruolo oncogenico di mTORC2 è stato recentemente analizzato, sembra che questo complesso sia importante per lo sviluppo e la progressione del cancro alla prostata indotto nel topo dalla perdita di PTEN [Guertin DA et al. 2009].

Akt e mTORC1/2 sono legati da feedback positivi e negativi che ne impediscono l'iperattivazione simultanea attraverso meccanismi che coinvolgono la p70S6K e PI3K.



**FIG. 4: Il pathway di mTOR, azione differenziale dei due complessi mTORC1 ed mTORC2.** (Teachey D, *Br J Haematol.* 2009 June ; 145(5): 569–580)

#### **2.2.4 Regolazione negativa della via di segnale PI3K/Akt/mTOR**

Il metodo più efficace per inattivare la via di segnale PI3K/Akt/mTOR è quello di impedire l'attivazione di Akt defosforilando il PtdIns(3,4,5)P3, prodotto da PI3K.

Il livello di PtdIns(3,4,5)P3 è finemente regolato grazie all'azione di fosfatasi lipidiche, in particolare PTEN che defosforila il PtdIns(3,4,5)P3 in posizione 3'-OH [Stambolic et al., 1998], e SHIP, che defosforila il PI(3,4,5)P3 in posizione 5'-OH [Rohrschneider et al., 2000]. Va però sottolineato che, mentre l'azione di PTEN si traduce in una drastica riduzione dell'attività di Akt, non si può dire altrettanto per SHIP.

La regolazione dell'attività di Akt dipende anche dal mantenimento del suo stato fosforilato, e in questo contesto svolgono un ruolo importante due proteinfosfatasi: PP2A [Andjelkovic et al., 1996] e PHLPP (PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase). La fosfatasi PP2A defosforila il residuo Thr308. Di una certa importanza, in questo processo, è l'interazione di Akt con il complesso HSP90/cdc37, che sembra svolgere in questo caso un ruolo protettivo, prevenendo l'azione della PP2A sulla Thr308 e mantenendo quindi Akt in uno stato attivo [Sato et al., 2000]. Le fosfatasi PHLPP1/2, che defosforilano il residuo Ser473, sono state identificate solo recentemente [Gao et al., 2005; Brognard et al., 2007]. Sono note due isoforme, che sembrano defosforilare in modo selettivo la Ser473 delle diverse isoforme di Akt. In particolare, PHLPP1 gioca un

ruolo nel metabolismo del glucosio, in cui Akt2 e' l' isoforma protagonista, mentre PHLPP2 agisce sulle vie di segnale di sopravvivenza cellulare, in cui Akt1 sembra avere il ruolo centrale [Brognard et al., 2007].

### **2.2.5 PI3K/Akt/mTOR, pathway di sopravvivenza**

Molti gruppi hanno dimostrato negli anni il ruolo critico ricoperto da Akt nel promuovere il *survival* a fronte di stimoli provenienti da fattori di crescita o in situazioni di stress cellulare. Il modo in cui Akt assolve questa funzione è bloccando direttamente proteine proapoptotiche o processi che determinano apoptosi.

Akt regola negativamente la funzione o l'espressione di una serie di proteine, denominate *Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins*, il cui ruolo a favore dell'apoptosi consiste nel legare o inattivare membri della famiglia di proteine *prosurvival*, Bcl-2.

Akt, ad esempio, inibisce direttamente la *BH3-only protein* BAD [Datta et al. 1997, delPeso et al. 1997] fosforilandola sulla S136, determinandone quindi il legame con le 14.3.3 e impedendole di interagire con i suoi target proteici proapoptotici.

Altro meccanismo tramite il quale Akt inibisce l'espressione di *BH3-only proteins* è la fosforilazione di fattori di trascrizione come FOXO e p53.

Akt fosforila FOXO1 sulle T24, S256 e S319, e fosforila FOXO3a e FOXO4 su tre siti equivalenti [Tran et al. 2003], determina anche in questo

caso il legame con le 14.3.3 che sequestrano i fattori di trascrizione FOXO, esportandoli dal nucleo, e impedendogli di interagire con i loro geni target proapoptotici (come il gene per il ligando Fas e Bim).

Un terzo target di Akt che promuove la sopravvivenza inibendo una *BH3-only protein* è MDM2, una ubiquitina ligasi che induce la degradazione di p53. Akt fosforila MDM2 sulle S166 e S186, ciò promuove la sua traslocazione al nucleo, dove regola negativamente la funzione di p53 [Mayo and Donner 2001; Zhou et al. 2001].

Akt fosforila inoltre la procaspasi-9 sulla S196, determinando in questo modo una riduzione della sua attività proteasica e quindi della sua capacità di indurre apoptosi.

Akt svolge il suo ruolo di *survival factor* mediante l'interazione con altri pathways; è già noto in letteratura che, in alcune condizioni, il pathway di PI3K/Akt attiva il fattore di trascrizione prosurvival NFκB e inibisce SAPK/JNK (Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase), chinasi che induce l'apoptosi in risposta a stimoli nocivi e all'azione di chemioterapici.

### **2.2.6 PI3K/Akt/mTOR nella regolazione del ciclo cellulare**

Una volta attivato, Akt stimola la proliferazione cellulare agendo su una serie di *targets* coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.

Akt fosforila p27kip1 sulla T257 [Liang J et al. 2002, Shin I et al. 2002, Viglietto G et al. 2002] e ne induce il sequestro nel citoplasma mediato dal legame con le 14.3.3 [Sekimoto T et al. 2004]. Non essendo più localizzato nel nucleo, p27 non può svolgere la sua funzione di inibitore della cdK2 e quindi la duplicazione del DNA, che altrimenti sarebbe stata bloccata, avviene; Akt inibisce p27 anche attraverso la fosforilazione e la conseguente inibizione dei fattori di trascrizione FOXO [Medema RH et al. 2000].

Anche p21Cip1/WAF1 viene fosforilato da Akt sulla T145, questa fosforilazione determina, come nel caso di p27, la localizzazione citosolica di questo inibitore [Zhou BP et al. 2001] e la progressione del ciclo cellulare.

Akt sembra inoltre inibire l'espressione di p21 attraverso la fosforilazione e l'attivazione di MDM2 che determina la downregolazione della trascrizione di p21 mediata da p53 [Mayo LD and Donner DB 2001, Zhou BP et al. 2001].

La fosforilazione Akt dipende da una serie di altre proteine come GSK3, TSC2 e PRAS40 guida la proliferazione cellulare attraverso la regolazione della sintesi e la stabilizzazione di fattori coinvolti nell'ingresso della cellula nel ciclo cellulare. GSK3 ad esempio, fosforila la ciclina D, la ciclina E e i fattori di trascrizione c-jun e c-myc, rendendoli un bersaglio



per la degradazione da parte del proteasoma; L'inibizione di GSK3 ad opera di Akt promuove la transizione dalla fase G1 alla fase S.

La proliferazione cellulare mediata da Akt è stata recentemente messa in relazione anche all'attivazione di mTORC1. L'effetto predominante degli inibitori di mTORC1, come la rapamicina, è quello di bloccare il ciclo in fase G1 [Skeen JE et al. 2006], la stimolazione della via di segnale di Akt porta all'attivazione di eIF4E attraverso l'inibizione esercitata da mTORC1 su 4E-BP1, in questo modo eIF4E promuove la traduzione degli mRNA che codificano per la ciclina D1 e c-myc.

### **2.2.7 PI3K/Akt/mTOR e il metabolismo cellulare**

Akt gestisce, in risposta ai fattori di crescita, l'assorbimento dei nutrienti e il metabolismo cellulare in maniera specifica, a seconda del tipo di cellula, e attraverso la regolazione di una serie di proteine target.

Una delle più importanti funzioni fisiologiche di Akt è quella di stimolare l'assorbimento del glucosio in risposta all'insulina.

In seguito a stimolazione insulinica negli adipociti, Akt2 l'isoforma più espressa nei tessuti insulino dipendenti è in gran parte associato a vescicole contenenti il trasportatore di glucosio Glut4 [Calera et al. 1998]. L'attivazione di Akt determina la traslocazione di Glut4 alla membrana plasmatica [Kohn et al. 1996] ma il meccanismo preciso tramite il quale avviene questa traslocazione non è ancora stato chiarito completamente;

Rab-GAP AS160 sembra essere il target diretto di Akt coinvolto in questo processo [Eguez et al. 2005, Sano et al. 2003]. Cinque sono i siti per Akt fosforilati, in AS160, in risposta all'insulina; di questi la S588 e la T642 sembrano essere quelli determinanti. Il modello proposto attualmente prevede che la fosforilazione Akt dipendente di AS160 inibisca la sua attività di *GTP-ase activating protein* (GAP), permettendo ad un'altra GTPasi della famiglia Rab di stimolare la traslocazione delle vescicole di Glut4. Recenti studi hanno suggerito un meccanismo alternativo per la regolazione di questo processo [Bai et al. 2007], e un altro candidato, substrato di Akt, coinvolto in varie fasi della traslocazione di Glut4 ossia PIKfive [Berwick et al. 2004].

Glut1 è il trasportatore di glucosio principale in molti tipi di cellule; l'attivazione di mTORC1, attraverso la fosforilazione di TSC2 e PRAS40 ad opera di Akt, contribuisce sia alla trascrizione del gene di Glut1 mediata da HIF $\alpha$ , sia alla traduzione del suo mRNA [Taha et al., 1999; Zelzer et al., 1998].

La frequente attivazione della via di segnale di PI3K/Akt nel cancro, insieme al grande accumulo di HIF $\alpha$ , spiega gli alti livelli di Glut1 e l'aumento dell'assorbimento di glucosio osservato nei tumori [Majumder and Sellers 2005, Semenza 2003].

Oltre al trasporto del glucosio, Akt sembra regolare l'espressione di altri trasportatori di nutrienti, sulla superficie cellulare, come gli aminoacidi, in

maniera dipendente da mTORC1 [Edinger and Thompson 2002]. Del resto il meccanismo mediante cui ciò avvenga non è ancora completamente chiaro.

L'attivazione di Akt altera il metabolismo del glucosio e quello lipidico nella cellula.

Una volta entrato nella cellula il glucosio viene convertito nella sua forma attiva, glucosio 6-fosfato grazie all'azione delle esochinasi, Akt stimola l'associazione delle esochinasi al mitocondrio, sede in cui esse maggiormente fosforilano il glucosio. Il target diretto di Akt in questo processo è ancora sconosciuto [robey and Hay 2006].

Il glucosio 6-fosfato può essere accumulato attraverso la conversione in glicogeno o catabolizzato per produrre energia attraverso la glicolisi, Akt può regolare entrambi questi processi.

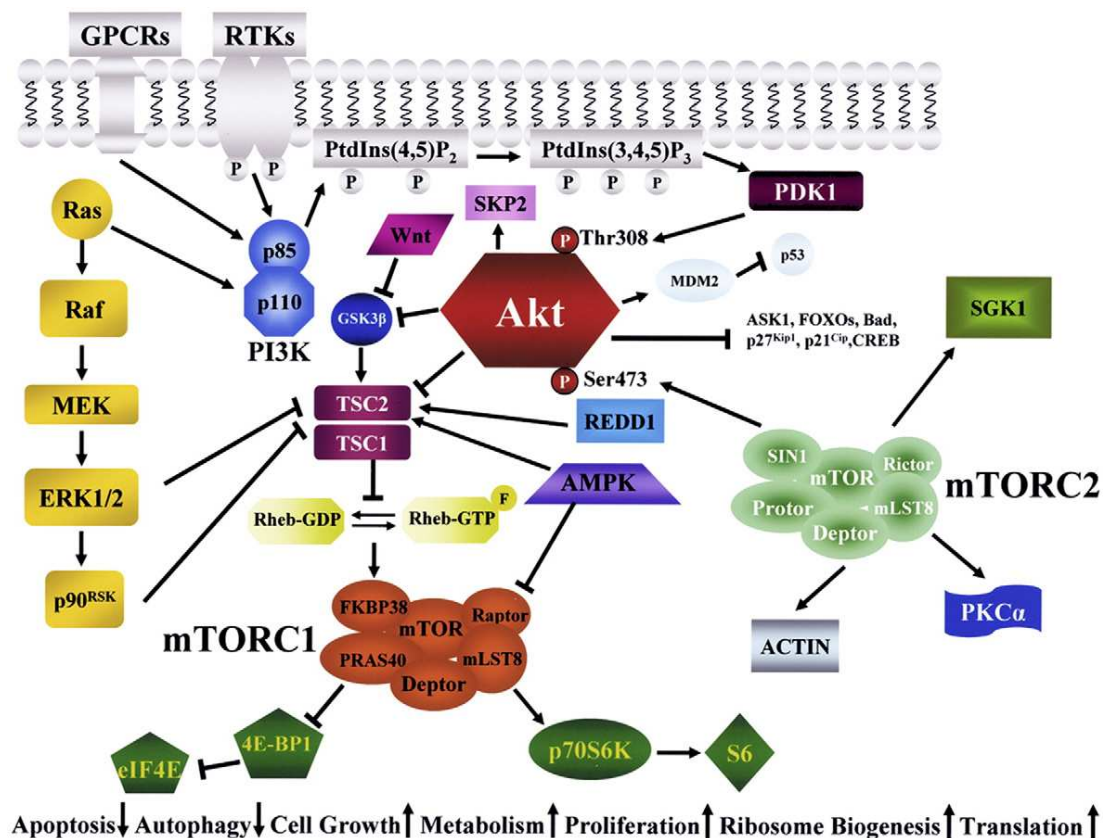
In maniera particolare nel muscolo e nel fegato, la fosforilazione e inibizione di GSK3 mediata da Akt fa sì che questa chinasi non fosforili la glicogenosintasi, e che quindi aumenti la sintesi di glicogeno.

L'attivazione di Akt può d'altro canto aumentare la glicolisi [Elstrom et al. 2004] e questo fattore probabilmente contribuisce a spiegare la natura altamente glicolitica delle cellule tumorali. La capacità di Akt di aumentare la glicolisi è dovuta alla sua capacità di promuovere l'espressione di enzimi glicolitici attraverso HIF $\alpha$  [Lum et al., 2007; Majumder et al., 2004; Semenza et al., 1994].

Anche la fosforilazione e inibizione di FOXO1, in maniera dipendente dal tipo di cellula, contribuisce all'omeostasi del glucosio, FOXO1 infatti promuove la produzione di glucosio epatico e regola il differenziamento delle cellule coinvolte nel controllo del metabolismo [Acilli and Arden 2004].

Negli epatociti, Akt può anche inibire la gluconeogenesi e l'ossidazione degli acidi grassi attraverso la diretta fosforilazione della S570 di PGC-1 $\alpha$  [Li et al. 2007], il quale coattivatore regola in concomitanza con FOXO1 e altri fattori di trascrizione l'espressione di alcuni geni.

Il signalling di Akt regola il metabolismo dei lipidi attraverso la fosforilazione e inibizione di GSK3, quest'ultimo promuove la degradazione delle SREBP (sterol regulatory element-binding proteins), fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo e degli acidi grassi. [Sundqvist et al. 2005].



**FIG. 5: La via di segnale PI3K/Akt/mTOR.** (Martelli A et al, Oncotarget. 2010 June ; 1(2): 89–103).

### 2.3 Inibizione di PI3K/Akt/mTOR, nuova strategia terapeutica

L'asse di trasduzione del segnale costituito da PI3K/Akt/mTOR, come è stato ampiamente descritto, ricopre un ruolo fondamentale nei meccanismi che regolano la proliferazione, la crescita e il *survival* cellulare, in condizioni fisiologiche. L'attivazione aberrante di questo pathway è stata osservata in molti tipi di cancro, ed in particolare nel 60-80% dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta. Proprio per questo motivo grande

interesse è tuttora rivolto all'elaborazione di farmacoterapie che abbiano come target specifico proprio questa via di segnale.

Una serie di composti chimici diretti ad inibire l'attivazione di PI3K, Akt ed mTOR è stata sintetizzata, e alcuni di questi sono già inseriti in trials clinici per il trattamento della LAM.

### **2.3.1 Inibitori di PI3K**

**LY294002** è un composto sintetico derivato dai flavonoidi. Oltre a bloccare l'attività di PI3K, svolge un'azione di inibizione anche su mTOR, DNA-PK, PimK, *polo like kinase*, e CK2. LY294002 si lega alla subunità catalitica di PI3K (p110) in corrispondenza del sito di legame per l'ATP, impedendo appunto che quest'ultimo gli si leghi. L'inibizione esercitata da LY294002 su PI3K è di tipo reversibile. A causa del suo alto grado di citotossicità e della sua completa insolubilità in acqua, LY294002 non ha trovato impiego nell'applicazione clinica, nonostante sia stato largamente utilizzato per studi preclinici sul modello LAM, in vitro.

### **2.3.2 Inibitori di Akt**

**Perifosina** è un'alchilfosfocolina sintetica, idrosolubile, che inibisce la fosforilazione di Akt attraverso l'interazione con il suo dominio PH e quindi impedendogli di ancorarsi alla membrana plasmatica. Recenti evidenze hanno dimostrato che la perifosina porta ad una downregolazione

di mTORC1/2 promuovendo la degradazione di alcune delle componenti di questi complessi [Fu L et al. 2009]. La perifosina induce, in una varietà di tumori e nelle stesse LAM, una riduzione della proliferazione cellulare e un incremento dei processi apoptotici, il tutto chiaramente correlato ad una diminuzione nella fosforilazione di Akt [van Blitterswijk et al. 2008].

In pazienti LAM con Akt costitutivamente attivo, la perifosina agisce in maniera sinergica con gli inibitori dell'istone deacetilasi [Rahmani M et al. 2005] o con la molecola pro apoptotica TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducine Ligand) [Tazzari PL et al. 2008].

Sono oggi in corso trials clinici di fase I che prevedono l'utilizzo di perifosina in associazione a derivati della staurosporina, e trials clinici di fase II basati sull'uso della sola perifosina, in pazienti affetti da LAM refrattaria e soggetti a ricadute. Del resto non è ancora possibile una valutazione coerente dei risultati ottenuti in questi trials.

**Triciribina (TCN)**, anche detta API-2, è una piccola molecola che inibisce la fosforilazione e quindi il grado di attività di tutte e tre le isoforme di Akt. Questo inibitore è altamente selettivo per Akt e non ha quindi alcun effetto nell'inibizione di PI3K, PDK1, PKC, SGK, PKA, Stat3, Erk 1/2 o JNK.

La Triciribina inibisce in maniera importante la crescita di cellule tumorali umane in cui Akt è attivo in maniera aberrante, in topi nudi, ma non la crescita delle stesse cellule tumorali in cui però Akt non è iperattivo.

Recenti studi attribuiscono l'inibizione di Akt alla capacità della Triciribina di interagire con il suo dominio PH.

Nello sviluppo di una serie di trials clinici è stato utilizzato l'estere 5-monofosfato della Triciribina (TCN-P), per la sua alta solubilità [Wotring et al. 1986].

TCN e TCN-P mostrano attività antivirale e antineoplastica a concentrazioni micromolari e nanomolari [Migawa et al. 2005]; già a partire dal 1980 TCN-P è stata identificata come inibitore della replicazione del DNA e della proteinosintesi, ed è stata utilizzata in studi preclinici sul trattamento di leucemie e carcinomi.

Un alto numero di trials clinici di fase I e II sono stati condotti su pazienti con tumori a stadiazione avanzata al seno, al colon, all'ovaio, al pancreas e alla lingua. Nonostante l'alta citotossicità di questa molecola la maggiorparte di questi trials clinici prevedevano l'uso di alte dosi di TCN per ottenere la massima efficacia. Tra gli effetti collaterali associati a questo trattamento ritroviamo epatotossicità, trombocitopenia, ipertrigliceridemia e iperglicemia che hanno quindi ridotto la sua applicazione in clinica.

Dal momento che TCN agisce in maniera selettiva su Akt è ragionevole pensare che tumori caratterizzati da alti livelli di Akt attivo siano molto più sensibili al trattamento con questo inibitore e che anche basse dosi possano essere efficaci evitando l'insorgenza di effetti collaterali. Trials clinici



introdotti recentemente sull'utilizzo di questo inibitore sono infatti basati sulla selezione di pazienti che presentino una iperattivazione di Akt.

**Inibitore VIII** è un composto derivato dai piperidinil benzimidazoloni, è un inibitore allosterico di Akt 1/2, e la sua attività è dipendente dal dominio PH di questa chinasi.

Una delle caratteristiche che ha reso interessante lo studio degli inibitori allosterici è il fatto che sono isozima specifici, diretti verso Akt1, Akt2 o entrambe le isoforme di questa chinasi come nel caso particolare dell'inibitore VIII, con un IC<sub>50</sub> di 58 nM per l'inibizione di Akt1 e 210 nM per quella di Akt2.

Questo tipo di inibitore previene sia la traslocazione di Akt alla membrana plasmatica, sia la sua attivazione mediante fosforilazione.

Diversamente dagli inibitori che competono con l'ATP per il legame con Akt, i quali una volta occupato l' *ATP binding site* consentono comunque la traslocazione di Akt in membrana e la sua fosforilazione, l'inibitore VIII blocca questa chinasi in una conformazione chiusa, con il sito di legame per i fosfolipidi bloccato dal dominio chinasi. Come risultato Akt rimane nel citosol, non può essere fosforilato e quindi attivato [Wen-I Wu et al. 2010] con un guadagno enorme nell'efficacia dell'inibizione rispetto alle molecole che competono con l' ATP.

L'inibitore VIII ha un altissimo potenziale come farmaco antitumorale con azione mirata al pathway di Akt e oggi è in corso una serie di studi volta a sottolineare la sua efficacia antitumorale su modello animale.

Tra gli inibitori allosterici già inseriti in trials clinici di fase I ne ricordiamo uno in particolare di recente utilizzo: MK-2206.

### **2.3.3 Inibitori di mTOR**

**Rapamicina** indicata anche con il nome di Sirolimus è un macrolide derivato dal batterio *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina è un inibitore allosterico di mTORC1 ma non lo inibisce direttamente bensì gli si lega solo dopo aver formato un complesso con FKBP12 (FK506 binding protein 12). Recenti studi hanno dimostrato che trattamenti a lungo termine con la Rapamicina hanno degli effetti anche sull'assemblaggio del complesso mTORC2 [Foster DA et al. 2009]. La Rapamicina ha un effetto modesto sulla sopravvivenza di cellule LAM in coltura, in ogni caso down regola la clonogenicità dei blasti LAM risparmiando i precursori ematopoietici normali [Recher C et al. 2005]. Molti studi hanno sottolineato una maggiore riduzione della sopravvivenza dei blasti LAM nei trattamenti a lungo termine con Rapamicina piuttosto che con quelli a breve termine [Xu Q et al. 2005]. Molti dei risultati ottenuti finora suggeriscono che il target della Rapamicina è quella parte di blasti LAM in

attiva proliferazione piuttosto che quella bloccata in fase G0-G1 del ciclo cellulare.

Pochi trials clinici di fase I/II sono stati messi a punto contemplando unicamente l'utilizzo della rapamicina o dei suoi analoghi, in pazienti affetti da LAM refrattaria o soggetti a ricadute.

La rapamicina induce del resto, una risposta in 4 su 9 pazienti affetti da LAM primaria o secondaria, che presentano una iperattivazione della via di segnale di mTORC1, documentata dagli alti livelli di p-p70S6K e di p-4EBP1 [Recher C et al. 2005].

Oggi, una serie di trials clinici è stata messa a punto per valutare nella LAM l'attività sinergica della Rapamicina e dei suoi analoghi con una serie di agenti chemioterapici.

**Torin1** è un membro della famiglia di inibitori delle chinasi delle *piridinonequinoline*; si lega ad mTOR nel suo *binding domain* per l' ATP, e competendo con quest' ultimo, determina l'inibizione di entrambi i complessi, mTORC1 ed mTORC2, con un valore dell' IC<sub>50</sub> compreso tra 2 e 10 nM [Carson C et al. 2009].

Torin 1 è un inibitore di mTOR altamente selettivo, e mostra una buona attività farmacodinamica di inibizione degli effettori a valle di mTOR nei tumori e nei tessuti periferici.

Questi risultati preliminari propongono Torin1 come utile mezzo per la comprensione dei fenomeni dipendenti dalla chinasi mTOR e come un primo passo verso lo sviluppo di inibitori specifici di mTOR che possano essere utilizzati in clinica [Qingsong Liu et al. 2010].

Molecular targets: specificity	Molecules	Clinical trials
PI3K and PIKK	Wortmanin (generic) LY294002 (generic)	
PDK1	KRX0601 (Kyowa Hakko Kogyo)	
PK3CD (PI3K p110 subunit delta)	IC87114 (ICOS) PCN12 (Piramed) PCN118 (Piramed)	
mTORC1	Rapamycin/Sirolimus (Wyeth) (Rapamune) Everolimus (Novartis) (RAD001/Afinitor)	phase II, NCT00634244 phase I, NCT00544999, NCT00636922, phase II in association with AMN107 NCT00762632 phase I in association with PKC-412 NCT00819546
	Temsirolimus (Wyeth) (CCI-779/Torisel) Deforolimus (Ariad) (AP23573)	phase II, NCT00084916 phase II NCT00086125
mTOR (TORKinhib)	Ku-0063794 (AstraZeneca)93 PP242 and PP3092	
PI3K and mTOR	PI-10386,87 NVPBEZ235( Novartis) BGT 226 (Novartis) XL 765 (Exelixis)	phase I in breast cancer NCT00620594 phase I-II solid tumor, breast cancer phase I solid tumor, malignant gliomas
AKT	PIAs Deguelin (generic) Perifosine (AEterna Zentaris) (KRX-0401) Tricibine (VioQuest) (VDQ-002 or API-2) KP372-1 (QLT) IGF-1/IGF1R NVP-AEW541 (Novartis) Anti-IGF-1 Ab: AVE-1642 (Sanofi-Aventis)	phase II, NCT00391560/ phase I, NCT00301938 in association with UCN-01 phase I, NCT00642031 phase I NCT00791544 metastatic liver carcinoma
SHIP1	AQX-016A (Aquinox) AQX-MN100 (Aquinox)	
Inhibitors of multiple kinases including PDPK	7-hydroxystaurosporine (Kyowa Hakko Kogyo) BAG956 (Novartis)	phase I, NCT00004263, NCT00301938
HSP90	Tanespimycin (Bristol-Myers Squibb)	phase II, NCT00514371 in multiple myeloma

**TAB. 2: Target Terapeutici della via di segnale PI3K/Akt/mTOR nella Leucemia Mieloide Acuta.**

(Park S at al, haematologica 2010, 95:5).

## **SCOPO DELLA RICERCA**

La leucemia mieloide acuta (LAM) è un gruppo eterogeneo di malattie clonali caratterizzato da una alterazione nei processi di differenziamento ed ematopoiesi, che porta ad una crescita smisurata delle cellule progenitrici mieloidi immature.

Nella maggior parte dei casi, pazienti LAM sottoposti a chemioterapia molto aggressive raggiungono inizialmente una completa remissione. Tuttavia, molti di questi sono soggetti a ripetute ricadute, e solo il 20% di essi ha una speranza di vita superiore a 5 anni. E' quindi comprensibile il grande interesse per nuove strategie terapeutiche nella cura di questa patologia.

Anche nella leucemia, come nella maggior parte dei tumori epiteliali, sono state riscontrate mutazioni attivatorie in recettori per fattori di crescita, amplificazione genica, presenza di loop autocrini [J M. Irish et al. 2004]. Tra gli oncogeni piu' frequentemente mutati nelle cellule leucemiche sono BCR-Abl, PI3K, Ras, p53, PTEN. Le cellule tumorali utilizzano le medesime vie di crescita e di sopravvivenza di quelle sane, tuttavia nel fenotipo maligno tali vie vengono sostanzialmente ricablate, aumentando ulteriormente il livello di complessita', gia' elevato, di questi meccanismi.

In particolare, studi condotti sui topi, cosi' come l'analisi della risposta ai trattamenti nei pazienti, hanno condotto alla conclusione che l'attivazione del dominio tirosinchinasico di recettori per fattori di crescita o di proteine di segnale a valle del recettore sia un passaggio fondamentale sia per l'esordio

che per il mantenimento del tumore. Questa dipendenza delle cellule tumorali dall'oncogene iniziale e' stata denominata "oncogene addiction" [I. B. Weinstein 2002]. Una chiave per il successo della terapia è quindi la descrizione precisa dei nodi funzionali della rete di segnali a valle degli oncogeni, la cui inibizione potrebbe provocare un errore nel sistema, in grado di tradursi nella cessazione del fenotipo tumorale attraverso apoptosi, necrosi, senescenza, o differenziamento cellulare.

Tuttavia, le attuali conoscenze molecolari sulle vie di segnale nella LAM si basano largamente su estrapolazioni da studi su linee cellulari, e in quanto tali non sono sufficientemente rappresentative del fenotipo dei segnali in una popolazione complessa come le cellule tumorali.

L'obiettivo generale di questo studio e' stato pertanto quello di utilizzare un'ampia coorte di pazienti LAM adulti (50), per analizzare contemporaneamente l'espressione e la fosforilazione di un numero molto elevato (92) di proteine di segnale, nel tentativo di fotografare il grado di attivazione delle principali vie di trasduzione del segnale implicate nei principali processi metabolici, nonché nella crescita, differenziamento e morte cellulare.

I risultati di questa analisi sono poi stati utilizzati per predisporre una seconda analisi, focalizzata sulle vie di segnale risultate più attive. Tra queste l'attenzione si e' concentrata sulle vie di trasduzione del segnale PI3K/Akt/mTOR, fondamentali per la regolazione dei processi di

sopravvivenza, crescita e apoptosi cellulare. Tali vie sono state descritte come attivate in maniera anomala nella LAM, e spesso associate ad una prognosi infausta, e sono pertanto considerate dei target per lo studio di farmaci mirati. In accordo con quanto riportato dalla letteratura, la prima analisi ha infatti mostrato che in circa il 60-80% di pazienti LAM è presente una iperattivazione della proteinchinasi Akt.

Partendo da queste premesse, la seconda parte dello studio ha avuto lo scopo di delineare i profili di risposta dei diversi pazienti al trattamento dei blasti freschi con inibitori specifici di PI3K, AKT e mTOR. Tutte le analisi sono state condotte mediante la tecnologia Reverse Phase Protein Array, che permette di descrivere simultaneamente su un numero elevato di campioni un numero molto elevato di proteine.



# **MATERIALI E METODI**

#### **4.1 Campioni**

Sono stati utilizzati, per due analisi successive, campioni di sangue midollare o periferico provenienti da due gruppi distinti di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML).

Il numero totale di pazienti coinvolti in questo studio è 50, 23 dei quali per la prima analisi e i restanti 27 per la seconda. Tutti i campioni, provenienti dal dipartimento di onco-ematologia del policlinico di Modena, sono stati raccolti al momento della diagnosi della malattia, per cui nessuno dei pazienti era stato sottoposto a chemioterapia precedentemente al prelievo.

Tutti i campioni sono caratterizzati da una percentuale di blasti superiore all'60%.

I dati clinici e demografici dei due gruppi di pazienti sono riportati nella tabella 3.

categorie	numeri	Categorie	numeri
No Casi	23	No Casi	27
F	9	F	7
M	14	M	20
<b>Età</b>		<b>Età</b>	
Prevalente	80	Prevalente	78
Media	69	Media	66
Minima	29	Minima	22
Massima	93	Massima	85
<b>FAB</b>		<b>FAB</b>	
M0	0%	M0	4%
M1	10%	M1	18%
M2	13%	M2	4%
M3	5%	M3	15%
M4	17%	M4	22%
M4 eo	0%	M4 eo	7%
M4/5	4%	M4/5	4%
M5	17%	M5	15%
RAEB	4%	RAEB	0%
Sconosciuta	30%	Sconosciuta	11%
<b>Prognosi</b>		<b>Prognosi</b>	
Intermedia	35%	Intermedia	42%
Favorevole	17%	Favorevole	14%
Sfavorevole	47%	Sfavorevole	44%
<b>Razza</b>	mediterranea	<b>Razza</b>	mediterranea
<b>Percentuale Blasti</b>	> 80%	<b>Percentuale Blasti</b>	> 80%

**TAB. 3: Dati clinici e demografici dei pazienti LAM, a) Ia analisi, b) IIa analisi.**

#### 4.1.1 Prima Analisi

I 23 campioni utilizzati per la prima analisi sono costituiti dalla frazione cellulare mononucleata proveniente da sangue periferico o midollare, separata mediante gradiente di Ficoll-Hypaque. I campioni cellulari appartenenti a ciascun paziente e raccolti nel corso di alcuni anni, sono stati conservati in azoto liquido, in presenza di Dimetilsolfossido 10%; una volta scongelati sono stati coltivati in terreno RPMI-1640 (EuroClone, CELBIO) con l'aggiunta di 20% di siero fetale bovino (heat inactivated) (FBS, EuroClone, CELBIO), penicillina-streptomicina 100U/ml (Lonza), L-

Glutamina 2mM (Lonza) ed HEPES (Acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) 250mM per 48 ore. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica ad una densità cellulare di  $1 \times 10^6$  cellule/ml.

Un'ora prima di essere raccolto, ciascun campione è stato suddiviso in due parti, una delle quali è stata trattata con DMSO 0,1% mentre l'altra con l'inibitore di PI3K/Akt, LY294002 (Sigma Aldrich) 20μM.

Quattro dei 23 campioni sono stati raccolti e pellettati subito dopo essere stati separati mediante gradiente di Ficoll-Hypaque.

#### **4.1.2 Seconda Analisi**

Nella seconda analisi sono stati utilizzati 27 campioni costituiti dalla frazione cellulare mononucleata proveniente da sangue periferico o midollare, separata mediante gradiente di Ficoll-Hypaque e coltivata in terreno RPMI-1640 con l'aggiunta di 20% di siero fetale bovino, penicillina-streptomicina 100U/ml, L-Glutamina 2mM ed HEPES 250mM per 16 ore circa.

Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica ad una densità cellulare di  $1 \times 10^6$  cellule/ml. Ciascun campione è stato sottoposto a trattamento con gli inibitori di Akt LY294002 (Sigma Aldrich) 20μM o/n, Triciribina (Cayman Chemical Company) 20μM o/n, Inibitore VIII di Akt1/2 (Calbiochem) 20μM o/n e Perifosina

(BioVision) 20 $\mu$ M o/n, e con gli inibitori di mTOR Rapamicina (Alexis Biochemicals) 20 $\mu$ M o/n, e torin1 250nM o/n (Inibitore non disponibile commercialmente, fornito da David M Sabatini, Whitehead Institute/MIT/HHMI). Al momento della raccolta ciascun campione è stato suddiviso in due pellet per consentirne l'analisi sia con la metodica dell' RPPA che con quella del Western Blot.

#### **4.2 Controlli e linee cellulari**

Sono state utilizzate come controllo dei differenti pathways, nella prima analisi di RPPA le linee cellulari commerciali di carcinoma epidermico A431 stimulate con EGF, Hela, Hela trattate con pervanadato, jurkat trattate con etoposide e con caliculina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), HEK293T, HEK293T trasfettate transientemente con il vettore di espressione PLKO, con Akt miristoilato e con Akt triplo mutante (T308A, S473A, K127A).

Nella seconda analisi di RPPA sono state utilizzate come controllo le linee cellulari commerciali Hela, Hela trattate con esteri del forbole, Hela trattate con pervanadato, Jurkat, jurkat trattate con caliculina, NIH 3T3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Lisati proteici di Cellule HL-60 e THP1 sono stati utilizzati come controllo nelle analisi in Western Blot. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI con 20% di siero fetale bovino, penicillina-streptomicina 100U/ml,

L-Glutammina 2mM incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica ad una densità cellulare di  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  cellule/ml.

### **4.3 Reverse Phase Protein Array**

#### **4.3.1 Conservazione dei campioni**

I pellet cellulari relativi ai vari campioni trattati e raccolti nel tempo, per essere sottoposti all'analisi in RPPA, sono stati conservati a – 80°C prima di essere lisati.

#### **4.3.2 Estrazione Proteica**

I pellet cellulari sono stati lisati utilizzando il buffer di lisi TPER (Pierce, Rockford, IL) cui è stato addizionato ortovanadato 1mM, NaCl 300mM e PIC 10mM (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich).

Una volta aggiunto il buffer di lisi, i campioni sono stati vortexati, lasciati in ghiaccio per venti minuti e successivamente centrifugati a 10.000 rpm per 5 minuti.

Il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf e quantificato utilizzando il metodo del Bradford (Bradford, 1976).

Ad una soluzione costituita da 800 µl di acqua e 1 µl di lisato proteico vengono aggiunti 200 µl di soluzione Bradford (BIO-RAD), la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm allo spettrofotometro permette di dosare una quantità di proteine compresa tra 1 e 5 µg mediante

interpolazione su di una retta di taratura costruita su standard di BSA da 0,5 a 5 µg.

I campioni sono stati preparati in modo da avere una concentrazione finale di 0,5 µg/µl.

Ad ogni lisato proteico è stata poi aggiunta Tris-glicina SDS NOVAX Sample Buffer 2X (Invitrogen) addizionata di 5% β-mercaptoetanolo e tutti i campioni sono stati fatti bollire a 100°C per 8 minuti.

#### **4.3.3 Deposizione delle Proteine su Supporto**

I lisati sono stati spottati utilizzando l'Arrayer Aushon 2470 (Biosystems, Affymetrix) (FIG. 6). Un "pin" trasferisce una quantità di lisato dell'ordine del nanolitro su una matrice di nitrocellulosa montata su un vetrino (FAST slides -Schleicher & Schuell-), determinando così la formazione di uno spot.



**FIG. 6: Arrayer Aushon 2470**

#### **4.3.4 Rivelazione delle Proteine mediante Immunostaining**

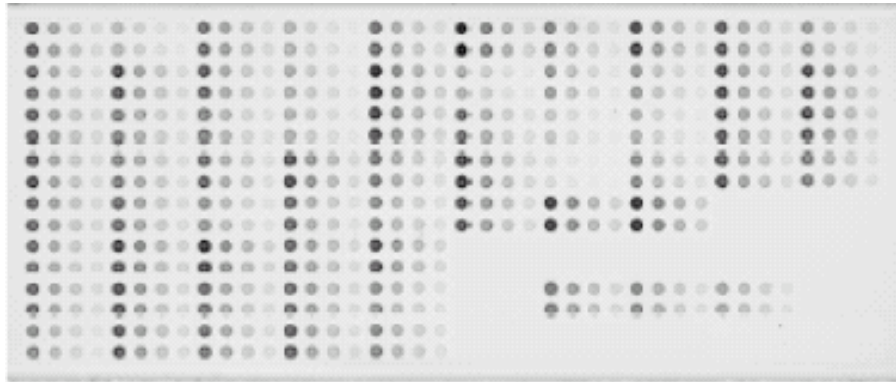
Una volta deposti i campioni sulle slides, queste sono state trattate per la durata di una notte con I-block (Applied Biosystem), dopodichè sono state incubate per 30 minuti con un anticorpo primario e successivamente, per altri 30 minuti, con l' anticorpo secondario della stessa specie coniugato ad una perossidasi. L'amplificazione della reazione è stata ottenuta mediante perossidazione del cromogeno diaminobenzidina (DAB) ad opera di una perossidasi biotinilata. Il reverse phase immunostaining è stato effettuato utilizzando uno stainer automatizzato (DAKO Autostainer Plus, DAKO Cytomation, Carpenteria, CA).

Sono stati utilizzati per la prima analisi 91 anticorpi primari (endpoints) e per la seconda analisi 20 anticorpi primari, tutti commercialmente disponibili. (Tabelle 4 e 5).

Prima di essere utilizzato, ciascuno degli anticorpi è stato validato in western blot, condizione necessaria è che determini la presenza di un'unica banda sulla lastra impressionata, all'esatto peso molecolare della proteina verso cui è diretto.

I campioni sono stati spottati secondo una curva di diluizione che prevede la presenza di un campione non diluito e delle sue successive diluizioni 1:2, 1:4, 1:8 (FIG. 7).





**FIG. 7:** Esempio di un vetrino su cui ciascun campione è stato spottato in forma non diluita e diluita secondo i rapporti 1:2, 1:4, 1:8.

Per ogni set di array sono stati introdotti un controllo negativo costituito da un vetrino incubato con il solo anticorpo secondario (vetrini distinti per differenti anticorpi secondari) che da origine ad una colorazione non specifica la quale, una volta quantificata, viene sottratta dall'array finale, e un controllo positivo costituito da una serie di lisati cellulari noti di cui si conosce l'espressione e il grado di attivazione delle diverse proteine di interesse.

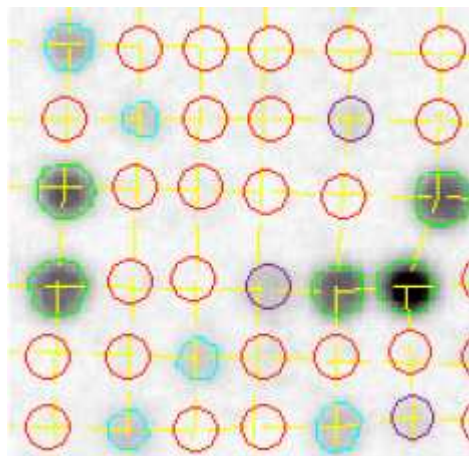
La variabilità di concentrazione delle proteine totali dei vari campioni è stata eliminata utilizzando un protocollo di normalizzazione basato sulla colorazione Sypro Ruby (Molecular Probes).

Il Sypro Ruby è un colorante permanente delle proteine, fluorescente, che ha una sensibilità che va dagli 0,25 a 1 ng di proteine su  $\text{mm}^2$ .

I vetrini sono stati, a questo punto, lavati 4 volte per 1 minuto con acqua bidistillata e posti ad asciugare a temperatura ambiente per 1 ora prima di essere scannerizzati.

#### 4.3.5 Analisi dei Dati

Successivamente alla scansione, l'analisi delle slides è stata effettuata mediante un software prodotto dalla Vigenetech (MicroVigene™, versione 2.2) il quale identifica singoli spot corrispondenti a singoli campioni ed associa a ciascuno di essi un valore corrispondente all'intensità dei pixel che li costituiscono. Ogni valore viene quindi normalizzato in relazione alla concentrazione delle proteine totali in modo da rendere possibile la comparazione tra differenti campioni.



**FIG. 8:** MicroVigene, immagine degli spot calcolati come aree che delimitano le proteine.

#### 4.3.6 Analisi Statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software "R", pacchetto *multtest*. Il *Wilcoxon tests* è servito a confrontare gruppi di pazienti appartenenti a differenti categorie individuate in base alla classificazione FAB o al tipo di prognosi.

I *P-values* sono stati ottenuti mediante un approccio di permutazione (*rawp*). La possibilità di avere falsi positivi è stata controllata mediante correzioni di molteplicità (metodo di Holm). I *p-value* aggiustati sono stati considerati significativi se inferiori al livello nominale 0.05.

E' infine stata generata una heatmap per sottolineare le relazioni tra le modalità di clasterizzazione e i livelli di espressione delle proteine analizzate. Per verificare l'ipotesi di correlazioni tra i tipi di clasterizzazione osservati e la prognosi associata ai pazienti è stato utilizzato il test del chi-quadrato.

1. AKT	cell signalling	1:50
2. EGFR	BioSource	1:100
3. ERK	cell signalling	1:100
4. ClCasp3 (D175)	cell signalling	1:50
5. phospho4EBP1 S65	cell signalling	1:100
6. phosphoAcetylCoA S79	cell signalling	1:100
7. phosphoAkt S473	cell signalling	1:100
8. phosphoCREB S133	cell signalling	1:100
9. phosphoERK T202-Y204	cell signalling	1:100
10. phosphoFKHR S256	cell signalling	1:100
11. phosphoFox01-03 T24-32	cell signalling	1:100
12. phosphoFKHRL1 S253	cell signalling	1:100
13. phosphoGSK3aB S21-9	cell signalling	1:100

14. phosphoIRS1 S612	cell signalling	1:200
15. phosphomTOR S2448	cell signalling	1:100
16. phosphomTOR S2481	cell signalling	1:100
17. phosphoPDGFRB Y716	cell signalling	1:100
18. phosphoSTAT1 Y701	cell signalling	1:100
19. phosphoSTAT3 S727	cell signalling	1:50
20. phosphoSTAT3 Y705	cell signalling	1:50
21. phosphocABL T735	cell signalling	1:50
22. phosphocABL Y245	cell signalling	1:100
23. phosphoAKT-PKB S473	cell signalling	1:100
24. phosphoAKT T308	cell signalling	1:100
25. phosphoAMPKA S485	cell signalling	1:100
26. phosphoAMPKB S108	cell signalling	1:100
27. phosphoARRESTINB1 S412	cell signalling	1:100
28. phosphoASK1 S612	cell signalling	1:50
29. phosphoBAD S112	cell signalling	1:200
30. phosphoBAD S136	cell signalling	1:200
31. phosphoBcl2 S70	cell signalling	1:100
32. phosphoBcl2 T56	cell signalling	1:100
33. ClCasp7 D198	cell signalling	1:50
34. CleavedCasp9 D330	cell signalling	1:50
35. phosphoCateninB S33-35-T41	cell signalling	1:100
36. phosphoCofilin S3	cell signalling	1:100
37. phosphoEGFR Y992	cell signalling	1:50
38. phosphoEGFR Y1045	cell signalling	1:100
39. phosphoEGFR Y1068	cell signalling	1:100
40. phosphoEGFR Y1148	cell signalling	1:100
41. phosphoEGFR Y1173	cell signalling	1:100
42. phosphoEIF4E S209	cell signalling	1:100
43. phosphoEIF4G S1108	cell signalling	1:100
44. phosphoENOS S113	cell signalling	1:100
45. phosphoENOS S1177	cell signalling	1:100
46. ENOSNOS S116	Upstate	1:100
47. phosphoERB2HER2 Y1248	Upstate	1:100
48. phosphoERB3HER3 Y1289	Upstate	1:100
49. phosphoETK Y40	cell signalling	1:100
50. phosphoFADD S194	cell signalling	1:50
51. phosphoFAK Y576 577	BD	1:100
52. phosphoGSK3aB Y2790216	BioSource	1:100
53. phosphoHISTONEH3 S10	Upstate	1:100
54. phosphoIGF1 YY	cell signalling	1:100
55. phosphoIGF1 YYYY	cell signalling	1:100
56. phosphoLKB1 S334	cell signalling	1:100
57. phosphoLKB1 S428	cell signalling	1:100
58. phosphoMARCKS S152 156	cell signalling	1:100
59. phosphoMEK1 S298	cell signalling	1:100
60. phosphoMEK1-2 S217 221	cell signalling	1:100
61. phosphoPKCpan	cell signalling	1:100
62. phosphoP38	cell signalling	1:100
63. phosphoP70 6SK	cell signalling	1:100
64. phosphoP90RSK	cell signalling	1:100
65. phosphoPDK1 S241	cell signalling	1:200
66. phosphoPKA T197	cell signalling	1:100
67. phosphoPKCaS257	cell signalling	1:100
68. phosphoPKCab T638-641	cell signalling	1:100

69. phosphoNFkB S536	cell signalling	1:100
70. phosphoPKC delta T505	cell signalling	1:100
71. phosphoPKC theta T538	cell signalling	1:100
72. phosphoPKC zeta lambdaT410-403	cell signalling	1:100
73. phosphoPRAS40 T246	BioSource	1:1000
74. phosphoPTEN S380	cell signalling	1:500
75. phospho A RAF S299	cell signalling	1:100
76. phospho B RAF S445	cell signalling	1:100
77. phospho C RAF S338	cell signalling	1:200
78. phospho RAS GRF1 S916	cell signalling	1:100
79. phospho RSK3 T356-360	cell signalling	1:100
80. phospho S6rb S235-236	cell signalling	1:200
81. phospho SAPK-JNK T183Y185	cell signalling	1:50
82. phospho SHC Y317	cell signalling	1:100
83. phospho SMAD2 S465-467	cell signalling	1:250
84. phospho STAT5 Y694	cell signalling	1:50
85. phospho IKBa S32-36	BD	1:50
86. AKT2	cell signalling	1:100
87. CREB	cell signalling	1:100
88. eNOS	cell signalling	1:100
89. NFkB	cell signalling	1:50
90. PI3-K	cell signalling	1:100
91. PTEN	cell signalling	1:100

**FIG.4:** Lista di Anticorpi primari utilizzati per la Ia analisi, con le rispettive diluizioni di utilizzo.

1. phospho4EBP-S65	Cell signalling	1:50
2. phosphoAKT T308	cell signalling	1:100
3. phosphoAKT S473	upstate	1:100
4. phosphoBAD S155	cell signalling	1:50
5. phosphoc ABL T735	cell signalling	1:50
6. AURORA	cell signalling	1:100
7. phosphoGSK3 AB S21/9	cell signalling	1:100
8. phosphoIRS1 S612	cell signalling	1:200
9. phosphoMTOR S2448	cell signalling	1:100
10. phosphoP70S6K T389	cell signalling	1:100
11. phosphoP90RSK S380	cell signalling	1:100
12. phosphoPDK1 S241	cell signalling	1:100
13. phosphoPRAS40 T246	BioSource	1:1000
14. phosphoPTEN S380	cell signalling	1:500
15. PTEN tot	cell signalling	1:100
16. phosphoSTAT3 S727	cell signalling	1:50
17. CATENIN b	cell signalling	1:100
18. CASPASE 6 CL. D162	cell signalling	1:50
19. CASPASE 9 CL D315	cell signalling	1:50
20. phosphoFADD S194	cell signalling	1:50

**FIG. 5:** Lista di anticorpi primari utilizzati per la IIa analisi, con le rispettive diluizioni di utilizzo.

## **4.4 Western Blot**

### **4.4.1 Estrazione Proteica**

I pellet cellulari raccolti per essere analizzati in western blot sono stati lisati in tampone RIPA buffer (Tris-Cl 20mM pH 7.0, glicerolo 10%, NP-40 1%, EDTA 10mM, NaCl 150mM, NaF 20mM, Sodio Pirofosfato 5mM, inibitori di proteasi 10mM, in ghiaccio.

Trascorsi 20 minuti dall'inizio della lisi, è stato eseguito un ciclo di sonicazione di 10 secondi dopodichè il campione è stato centrifugato a 13.000 rpm per 15 minuti a 4°C.

Il surnatante è stato poi trasferito in una nuova eppendorf e quantificato utilizzando la metodica del Bradford.

### **4.4.2 SDS page e western blot**

Campioni costituiti da una stessa quantità di lisato proteico (80-100 µg) sono stati separati mediante SDS PAGE. Ad ognuno di essi è stato aggiunto SDS Sample buffer (Tris-Cl 20mM pH 7.8, SDS 2%, glicerolo 20%, DTT 0,6 M, blu di Bromofenolo) dopo di che sono stati fatti bollire a 100°C per 5 minuti.

La corsa elettroforetica è stata fatta avvenire su gel di acrilammide a percentuale variabile (8-12%) utilizzando l'apposito apparecchio a 25 mA per 1 ora circa.

Le proteine sono state poi trasferite su una membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) Immobilon-P (MILLIPORE). Il trasferimento è stato fatto avvenire nell'apposito apparecchio, in una condizione "semi-dry" a 110mA per un tempo variabile a seconda delle dimensioni del gel e dei pesi delle proteine di interesse.

La membrana è stata poi incubata con il tampone TBS-Tween (Tris-Cl 50mM pH7.5, NaCl 50mM, Tween20 0,1%) contenente BSA 5% per 1 ora, con un anticorpo primario nella diluizione opportuna per un tempo di 16h a 4°C e con un anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi per 20 minuti a temperatura ambiente. Le incubazioni con l'anticorpo primario e secondario sono state entrambe seguite da 3 lavaggi, di 5 minuti ciascuno, con TBS-Tween.

Gli anticorpi sono stati rivelati mediante l'utilizzo di una soluzione di luminolo e  $H_2O_2$  che, per azione della perossidasi, dà origine ad una reazione di chemiluminescenza in corrispondenza del punto in cui si è formato il complesso antigene anticorpo. Una lastra fotografica viene a questo punto sovrapposta, per tempi brevi e variabili, alla membrana di PVDF per essere impressionata dalla luce emessa a seguito di questa reazione. In alternativa alle lastre fotografiche, il segnale luminoso può essere acquisito mediante lo strumento Kodak Image Station 440 CF.

# **APPROCCIO SPERIMENTALE**



## **Reverse Phase Protein Array**

Una completa analisi delle basi molecolari del cancro, come di una vasta serie di altre patologie, richiede l'integrazione di conoscenze distinte ma allo stesso tempo complementari, provenienti dai campi della genomica e della proteomica.

Se l'utilizzo dei micro-array di DNA è focalizzato sull'analisi dei difetti genetici che potrebbero causare alterazioni nel signalling cellulare, gli array di proteine aggiungono informazioni cruciali circa lo stato funzionale di queste vie di segnale alterate.

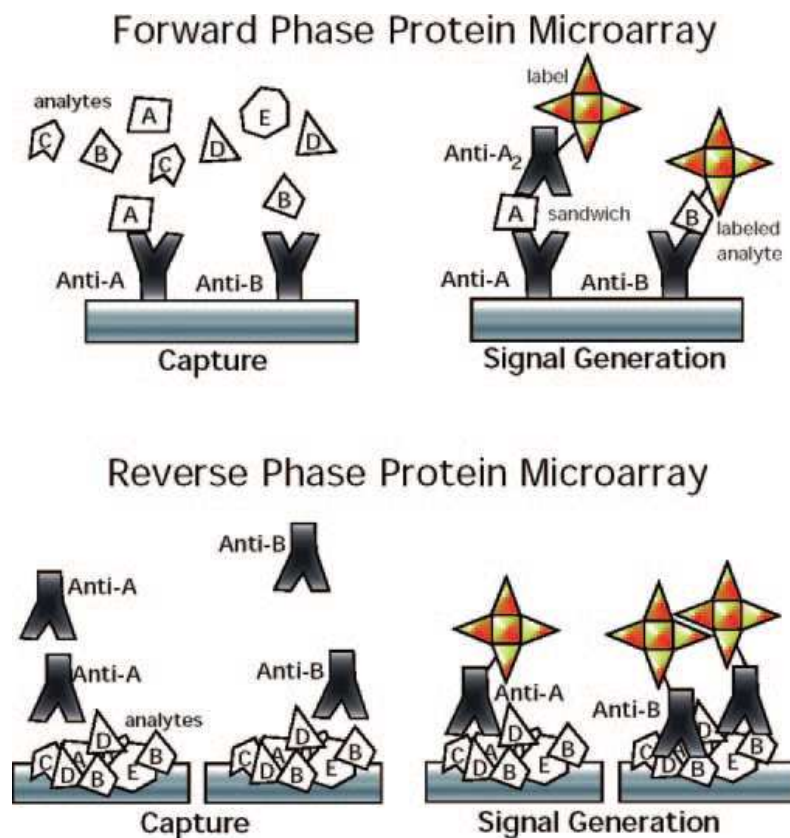
Sono state sviluppate due categorie di array di proteine: quella dei *Forward Phase Protein Array* e quella dei *Reverse Phase Protein Array* (FIG. 5).

Nei *Forward Phase Protein Array*, l'analita di interesse viene catturato da una molecola, solitamente costituita da un anticorpo primario, immobilizzata su di un substrato di nitrocellulosa e che funge quindi da esca.

Ogni array, costituito da molteplici spot ciascuno dei quali corrispondente ad un diverso anticorpo, viene incubato con il campione da analizzare che può ad esempio consistere in un lisato cellulare. Questo tipo di analisi permette di ottenere informazioni contemporanee relative ai molteplici analiti che costituiscono il campione di partenza.

Al contrario nei *Reverse Phase Protein Array* (RPPA) è il campione da analizzare ad essere immobilizzato su un substrato, sicchè un unico array

può essere costituito da centinaia di differenti campioni provenienti da pazienti o lisati cellulari. Ciascun array viene incubato con un anticorpo primario e la misura di un singolo analita nei differenti campioni consente quindi di effettuare analisi di tipo comparativo.



**FIG. 5: Forward Phase Protein Array e Reverse Phase Protein Array.**

L'utilità dell' RPPA sta dunque nella sua capacità di fornire, in breve tempo e utilizzando una quantità ridotta di analista, una mappa dello stato di attivazione dei principali network proteici cellulari e di identificare nodi cruciali o interazioni specifiche nelle cascate di trasduzione del segnale.

Un protocollo di RPPA solitamente comprende una serie di fasi che sono, la raccolta dei campioni, l'estrazione di proteine dai campioni, la deposizione dei campioni su di un vetrino rivestito da nitrocellulosa ed infine la rivelazione della proteina di interesse.

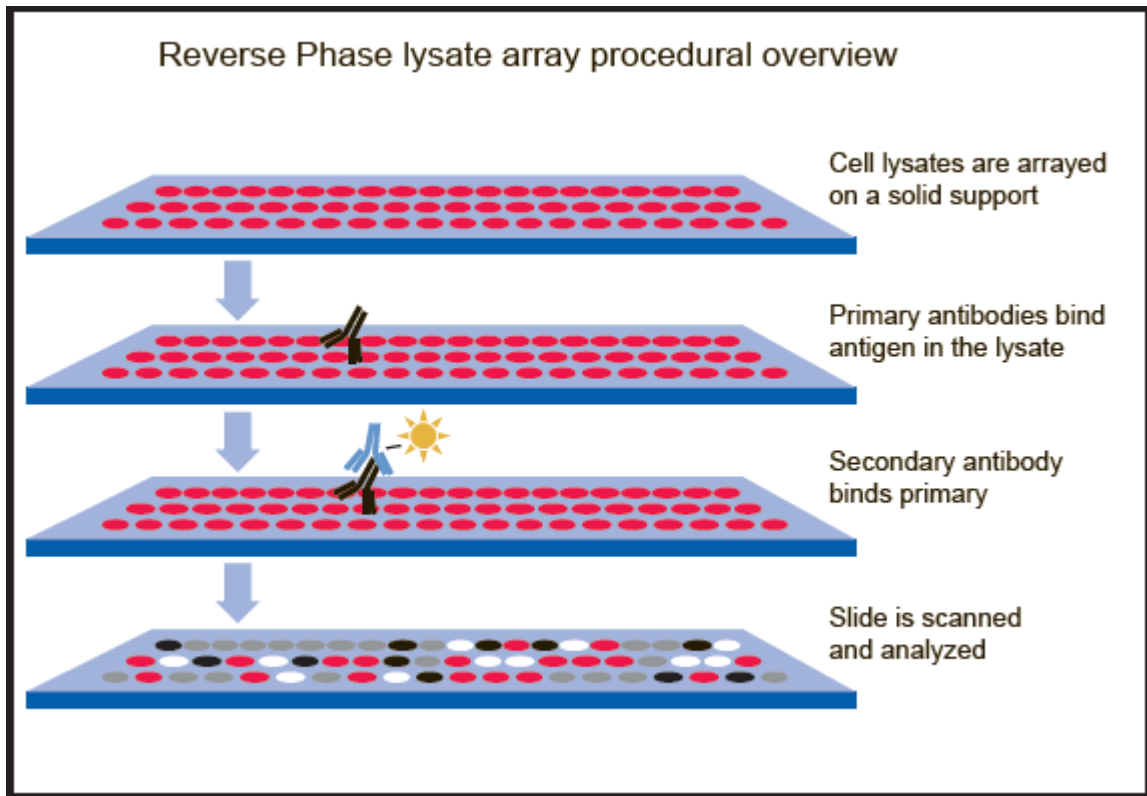
In dettaglio una volta estratte le proteine, i campioni vengono spottati mediante un arrayer su di un vetrino ricoperto da un substrato di nitrocellulosa. La nitrocellulosa viene solitamente scelta per la sua capacità di legare fortemente le proteine senza alterarne la struttura.

Il vetrino viene incubato con un anticorpo primario che viene a sua volta legato da un anticorpo secondario biotinilato; successivamente, si ha una fase di amplificazione del segnale, e la rivelazione della proteina di interesse mediante perossidazione del cromogeno diaminobenzidina. L'intensità del segnale rilevata è proporzionale alla quantità di proteina immobilizzata e legata all'anticorpo primario specifico.

Infine, ogni array viene scannerizzato, viene analizzata l'intensità di segnale proveniente da ogni spot, i dati ottenuti vengono normalizzati e standardizzati grazie all'utilizzo di software specifici, finché è possibile assegnare ad ogni spot un unico valore.

Riassumendo, tra i vantaggi dell'RPPA possiamo sicuramente citare l'elevata efficienza, sensibilità e specificità del sistema, la possibilità di analizzare un ampio numero di campioni in breve tempo e utilizzando esigue quantità di lisato proteico, inoltre è da considerare una importante

riduzione dell'errore sperimentale dovuta alla standardizzazione delle condizioni cui viene sottoposto ogni campione.



**FIG. 6: Reverse Phase Protein Array, metodica.**

L'RPPA è già da alcuni anni ampiamente utilizzato per l'analisi proteomica di diverse patologie che vanno dal carcinoma ovarico, al cancro alla prostata, alla mammella, al colon, alle leucemie e via di seguito.

Gli obiettivi comuni a tutti questi studi sono quello di comprendere quali siano le alterazioni delle vie di segnale cellulari caratteristiche di queste patologie, come sia possibile ricondurre eventuali processi di

metastatizzazione a precise alterazioni ed infine cercare di gettare le basi per l'elaborazione di farmacoterapie personalizzate.

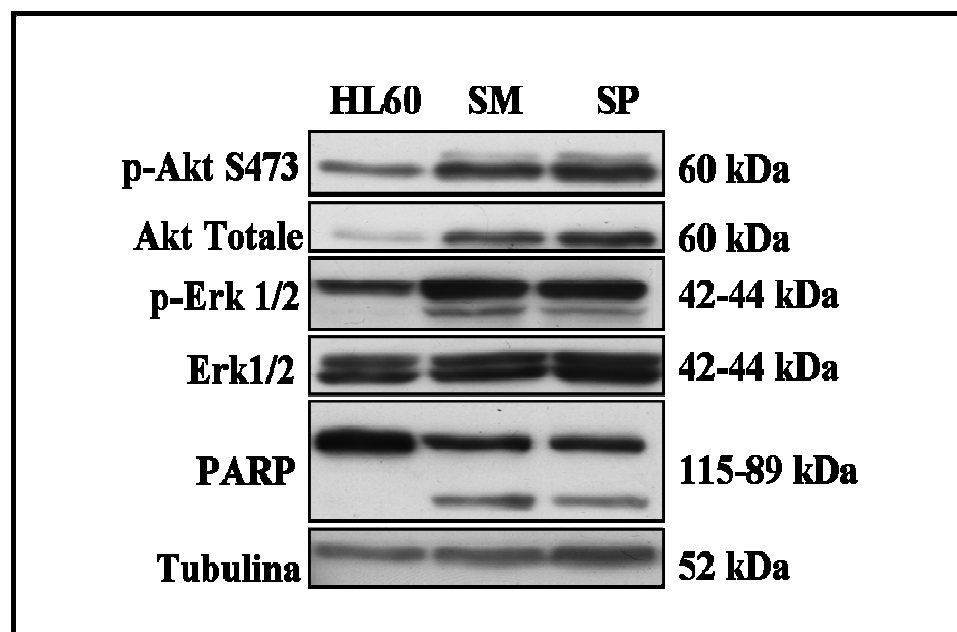
# **RISULTATI**

## **6.1 Campioni provenienti da sangue midollare e periferico possono essere utilizzati indifferentemente**

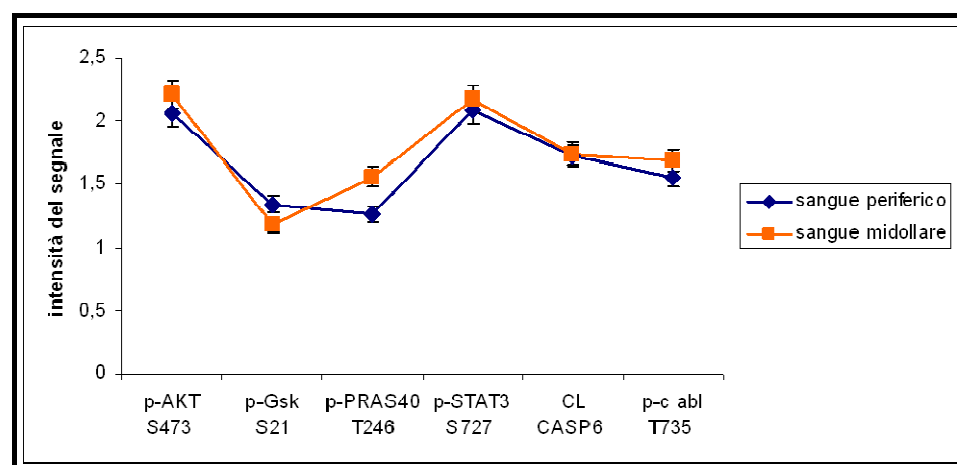
In questo studio sono stati analizzati campioni provenienti da sangue midollare e/o periferico di 50 pazienti affetti da leucemia mieloide acuta e comparati tra loro per evidenziare variazioni nell' espressione e nello stato di attivazione di un vasto numero di proteine.

E' stato necessario, quindi, verificare che la provenienza del campione non influisse in maniera rilevante sul tipo di analisi effettuata.

Pertanto, utilizzando le tecniche del western blotting e dell' RPPA sono stati analizzati i livelli di espressione e di fosforilazione di alcune componenti chiave nei processi di trasduzione del segnale, in campioni di sangue midollare e periferico prelevati nello stesso giorno dai medesimi pazienti (FIG. 1A e 1B). Il risultato dimostra chiaramente che campioni provenienti da sangue midollare e periferico possono essere utilizzati indistintamente, poiché le differenze rilevate non risultano significative.



**A**



**B**

**FIG. 1**



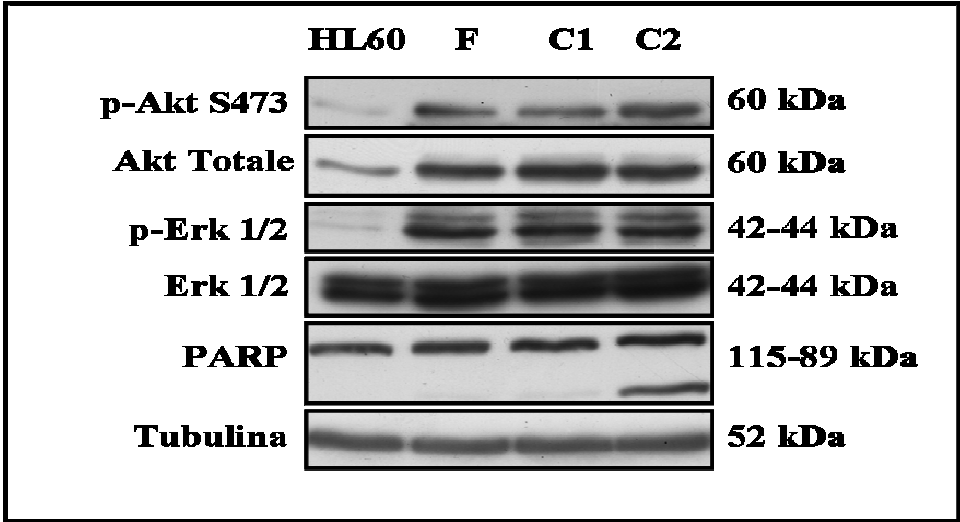
## **6.2 Campioni freschi e crioconservati presentano livelli paragonabili di espressione e fosforilazione proteica**

Oltre alle cellule ottenute dal prelievo fresco, per questo studio abbiamo avuto accesso alla banca di blasti in DMSO del prof. Giuseppe Torelli (Dip. Di oncologia, Ematologia e malattie respiratorie, sezione di ematologia, Università di Modena and Reggio Emilia). Le cellule fresche sono purificate, immediatamente dopo il prelievo, con lo stesso protocollo e gli stessi tempi di preparazione che erano stati utilizzati per gli stock in DMSO. Tuttavia, le cellule fresche sono state trasferite in medium di crescita, con o senza inibitori, subito dopo la purificazione. Le cellule in DMSO sono state scongelate in medium di coltura e trattate allo stesso modo delle fresche.

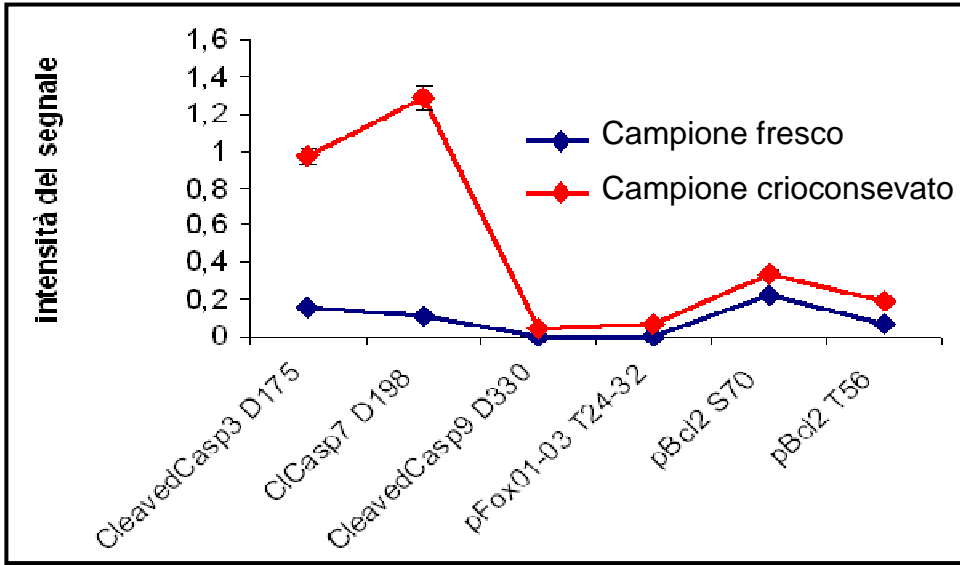
Per verificare che il congelamento in DMSO non influisse sull'espressione e/o sullo stato di fosforilazione delle proteine, alcuni campioni freschi sono stati suddivisi in aliquote dopo la purificazione: una aliquota e' stata immediatamente diluita in terreno di crescita, mentre l'altra ha subito un congelamento in DMSO. Successivamente, i campioni in DMSO sono stati scongelati e mantenuti in terreno di crescita per un numero di ore uguale ai loro duplicati, poi analizzati insieme al corrispettivo fresco mediante western blotting e RPPA.

Anche in questo caso, valutando i livelli di espressione e di fosforilazione di alcune proteine di segnale che hanno un ruolo chiave in diversi processi

cellulari, quali Akt ed Erk, non sono state riscontrate differenze significative tra cellule fresche e crioconservate provenienti dallo stesso prelievo. Va tuttavia sottolineato che se le cellule sono sottoposte ad ulteriori cicli di congelamento/scongelamento, diventano dosabili i marcatori comuni dell' apoptosi, come evidenziato dalla presenza del frammento proteolitico da 80kDa della proteina PARP (Poly ADP-ribose Polymerase) (FIG. 2A, lane c2) e del frammento proteolitico delle caspasi 3, 7 e 9 (FIG. 2B).



A



B

FIG. 2

### **6.3 Fosforiloma generale in pazienti LAM**

Allo scopo di descrivere il fosforiloma generale dei pazienti LAM, le proteine totali dei blasti da sangue periferico o midollare sono state estratte come descritto nella sezione metodi, e denaturate con un buffer compatibile sia con l'analisi western blotting che RPPA. Successivamente, aliquote di ogni campione sono state caricate, in duplicato, su 92 vetrini ricoperti di nitrocellulosa, attraverso l'utilizzo di un braccio meccanico, e sottoposti ad incubazione con anticorpi selezionati così da identificare pathways proliferativi, apoptotici, di progressione del ciclo cellulare, e metabolici.

Osservando la heatmap (FIG. 3) prodotta dall'analisi RPPA, è possibile circoscrivere tre aree in cui i segnali della scala pseudocolor utilizzata indicano un'intensa espressione o fosforilazione proteica. Le due aree centrali sono circondate da aree verdi, indice di una intensità di segnale, e quindi di espressione/fosforilazione, inferiore.

A partire dall'evidente differenza di attivazione dei pathways di trasduzione del segnale nei differenti pazienti LAM, abbiamo cercato di correlare queste differenze alle caratteristiche cliniche dei pazienti.



#### 6.4 Correlazione tra profili proteici e classificazione FAB

Come descritto in precedenza, la classificazione morfologica, o FAB, distingue le leucemie mieloidi acute in base al tipo di blasto che le caratterizza, e al suo grado di maturazione. Recenti pubblicazioni hanno ipotizzato l'esistenza di correlazioni tra la classificazione FAB e i differenti profili di espressione e attivazione proteica di pazienti LAM (Kornblau SM et al 2009). Pertanto, la heatmap e' stata rielaborata in modo da mettere in relazione l'espressione/fosforilazione delle proteine in esame con i gruppi FAB (FIG. 4), il tipo di analisi statistica che ha permesso di confrontare pazienti appartenenti a categorie differenti è il *Wilcoxon test*. La heatmap così' ottenuta mostra una clusterizzazione diversa delle proteine. Seguendo l'andamento di alcuni dei pathways di trasduzione del segnale, si nota una netta differenza tra lo stato di attivazione di queste vie di segnale nei gruppi FAB M1/M2, (leucemie mieloidi) rispetto agli M4/M5 (leucemie monocitiche).

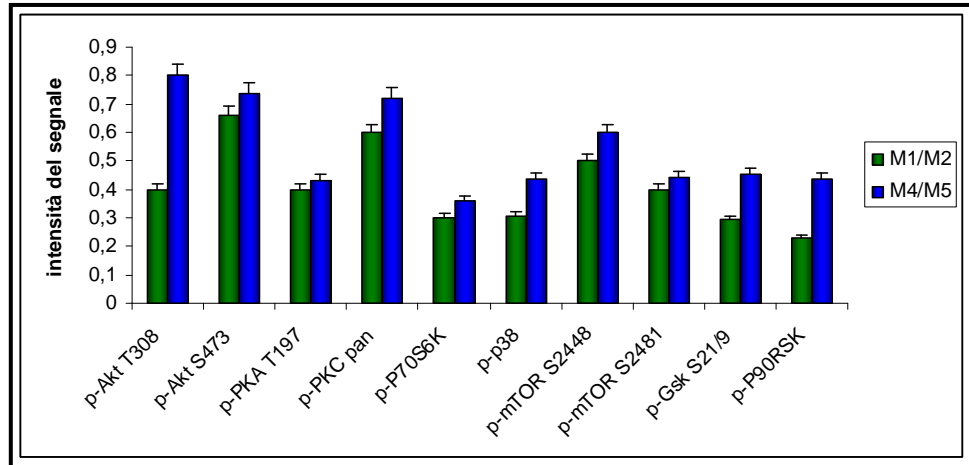
In particolare, la Figura 5A mostra come i pazienti con livelli di attivazione di p-Akt, p-PKA, p-PKC, p-mTOR, p-GSK, p-p70S6K, p-p90RSK e p-p38 più bassi clusterizzino preferenzialmente nei gruppi FAB M1/M2, mentre quelli con alti livelli di queste fosfoproteine clusterizzano nei gruppi FAB M4/M5.

Allo stesso tempo si puo' notare come i gruppi FAB M1/M2 presentino un secondo cluster arricchito in fosfoproteine che regolano i processi

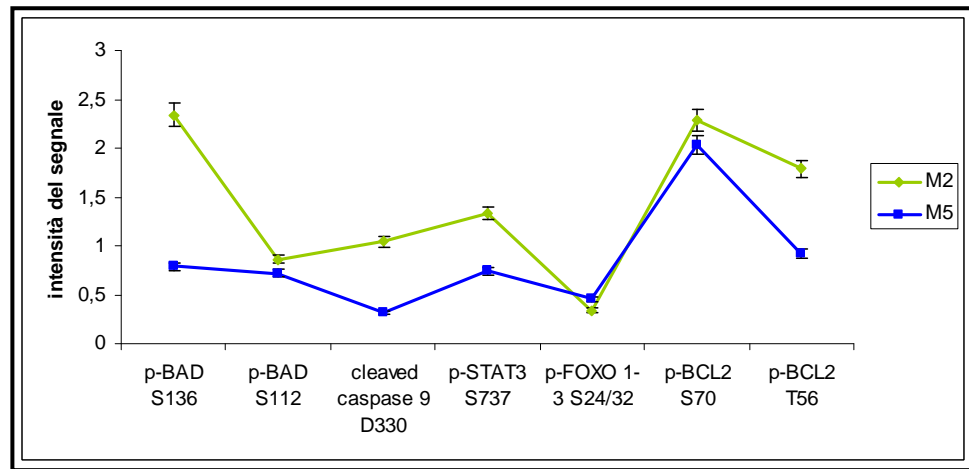
apoptotici, rispetto al gruppo FAB M4/M5. Questo diverso comportamento è chiaramente mostrato nella Figura 5B, che analizza in dettaglio l'attivazione del pathway apoptotico di un paziente LAM M2 rispetto a quello di un paziente LAM M5. Infatti, la fosforilazione di BAD sulla serina 136 e 112, indice di fosforilazione da parte di p90rsk e Akt rispettivamente, e' correlabile con l'attivazione di un processo apoptotico, come pure la fosforilazione di Bcl2 sulla serina 70 e sulla treonina 56 a valle del pathway ASK1/MKK7/JNK1. Allo stesso modo, e' rilevabile un aumento del frammento da 37 kDa della caspasi 9. Nell'insieme, il profilo di queste proteine indica chiaramente che le LAM di gruppo FAB M2 hanno processi apoptotici piu' attivi rispetto ad M5. Questo comportamento potrebbe in parte spiegare la migliore prognosi che si osserva in generale nei pazienti di gruppo M2 rispetto ad M5.







**A**



**B**

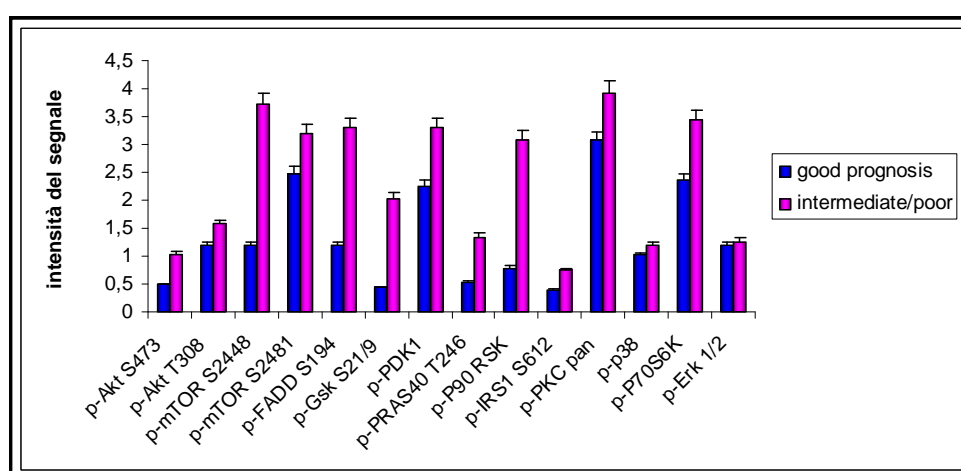
**FIG. 5**

## 6.5 Correlazione tra profili proteici e prognosi

Basandoci sui precedenti risultati, abbiamo quindi verificato l'ipotesi di una correlazione tra l'attivazione differenziale di determinate vie di segnale e il tipo di prognosi associata ai pazienti.

I tre tipi di prognosi, favorevole, intermedia e sfavorevole, sono solitamente attribuiti ad un paziente affetto da leucemia mieloide acuta in relazione alla presenza di un cariotipo più o meno alterato o talmente alterato da essere definito complesso.

I pazienti con prognosi favorevole si differenziano da quelli con prognosi intermedia o infausta per il profilo di fosforilazione di alcune proteine di segnale, quali p-Akt S473, p-PKC, p-P70S6K, p-PDK1, p-GSK S21/9, p-p90RSK e p-mTOR, più elevato nei pazienti con prognosi meno favorevole (FIG. 6). Nell'insieme questo profilo identifica una “signature” che potrebbe essere molto utile nella definizione della terapia.



**FIG. 6**

## **6.6 Correlazione tra profili proteici ed espressione del recettore c-Kit**

Il recettore tirosin chinasi c-Kit è espresso nel 60-80% dei pazienti LAM, e nel 17% dei casi presenta una mutazione attivatoria a carico dell' internal tandem duplication (ITD) a livello dell'esone 11, che codifica per il dominio extra-cellulare, associata a crescita indipendente dal ligando; tale attivazione aberrante è un elemento caratteristico della patologia, e di solito associata ad una diminuzione della speranza di vita e ad un aumento della probabilità di ricaduta.

In cellule Baf3 in vitro trasfettate con KIT cITD umano, è stata osservata l'attivazione costitutiva della via di segnale PI3K/AKT, nonché la fosforilazione costitutiva di STAT1, STAT3, STAT5 and SHP-2.

Abbiamo perciò voluto verificare l'esistenza di una corrispondenza tra l'espressione del recettore c-Kit nei pazienti AML e l'attivazione delle sue proteine effettrici nei processi di trasduzione del segnale.

L'analisi clinica di immunofenotipizzazione cui è stata sottoposta la maggior parte dei pazienti analizzati in questo studio ci ha permesso di valutare il grado di espressione del recettore c-Kit e di metterlo in relazione ai livelli di attivazione ed espressione di una serie di proteine, rilevati mediante RPPA, in ciascun paziente.

Il risultato di questa analisi ha sottolineato come pazienti con una elevata espressione di c-Kit abbiano livelli di attivazione della via di segnale

PI3K/Akt/mTOR molto più alti rispetto a quei pazienti caratterizzati da una bassa espressione di questo recettore (FIG. 7).

La heatmap in figura 8 mostra la netta separazione tra pazienti con alta espressione di c-Kit,, cui si associa un profilo *rosso*, e pazienti con bassa espressione di c-Kit, cui si associa un profilo *verde*.



## **6.7 Identificazione di pazienti con alti livelli di fosforilazione di Akt responsivi e non responsivi al trattamento con l'inibitore LY**

E' ampiamente descritto dalla letteratura recente che il 60% dei pazienti LAM e' caratterizzato da una iperfosforilazione della proteinchinasi Akt. Tuttavia, non e' chiaro quali siano i valori di riferimento che permettono di stabilire quando la fosforilazione di Akt possa essere considerata alta.

Cellule linfocitiche di leucemia linfoblastica CEM selezionate per la resistenza ai chemioterapici vinblastina e doxorubicina (CEM MDR) hanno alti livelli di fosforilazione di Akt, presumibilmente dovuti ad una bassa espressione della fosfatasi lipidica PTEN, che quindi mantiene elevati livelli di agonista PI3,4,5P3, e della fosfatasi proteica PHLPP, il che comporta la mancata de fosforilazione, della serina 473 di Akt (Maraldi et al. 2010). Analogamente, il livello di fosforilazione di Akt in cellule HEK293 è costitutivamente molto elevato. Abbiamo quindi arbitrariamente creato una scala dei valori di p-Akt attribuiti ai pazienti LAM analizzati in questo studio, stabilendo che i valori di fosforilazione di Akt 473 compresi tra CEM-MDR e HEK293 siano indicativi di alta fosforilazione di Akt. La figura 9 mostra che, in accordo con la letteratura, utilizzando questi riferimenti circa il 60% dei pazienti LAM analizzati è caratterizzato da alti livelli di Akt.

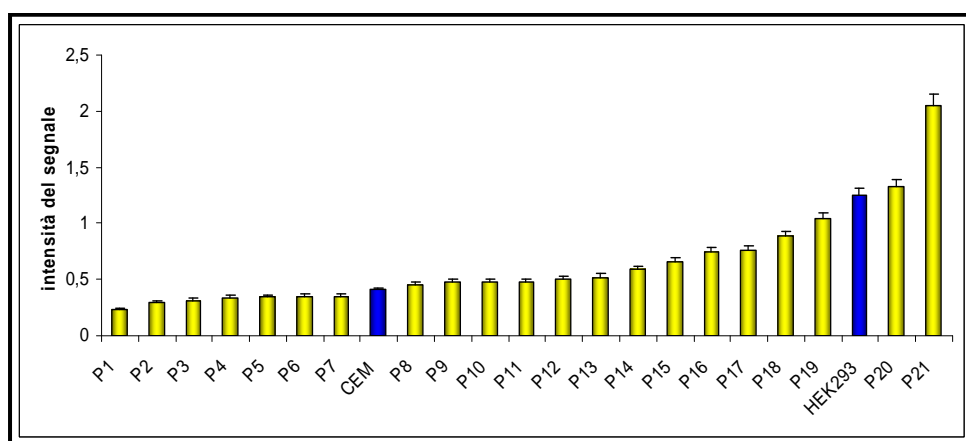
Inoltre, i blasti freschi ottenuti dai pazienti LAM sono stati mantenuti in terreno di crescita, in presenza o meno dell'inibitore della PI3K, LY294002.

Inaspettatamente, l'analisi RPPA dimostra che solo una parte dei pazienti LAM ha risposto al trattamento con la riduzione della fosforilazione di Akt e degli altri effettori a valle di PI3K; la restante parte dei pazienti è risultata non responsiva.

La Figura 10 mostra un esempio, rappresentativo delle due popolazioni di campioni sensibile o non al trattamento con LY294002. La heatmap dei due pazienti (FIG. 10A) mostra chiaramente che l'intensità dei segnali nell'area corrispondente al pathway a valle di PI3K (rettangolo giallo), e' significativamente piu' bassa in presenza di inibitore. Si puo' inoltre notare che, mentre tutte le proteine target di Akt sono proporzionalmente meno fosforilate nel campione sensibile al trattamento, nel campione non sensibile, dove la fosforilazione dei substrati di Akt rimane costante anche in presenza di inibitore, la fosforilazione di PDK1 S241 viene abbassata. La serina 241, nel loop di attivazione, e' un sito di auto-fosforilazione di PDK1, essenziale per l'attività'. Questa osservazione ci ha permesso di speculare che LY294002 sia efficace nell'abbassare l'attività' di PI3K, e che la anomala fosforilazione di Akt in questi campioni dipenda da altri fattori, legati ad esempio agli enzimi di regolazione come PP2A, PTEN o PHLPP. A questo proposito, infatti, e' stato riportato che in alcuni pazienti

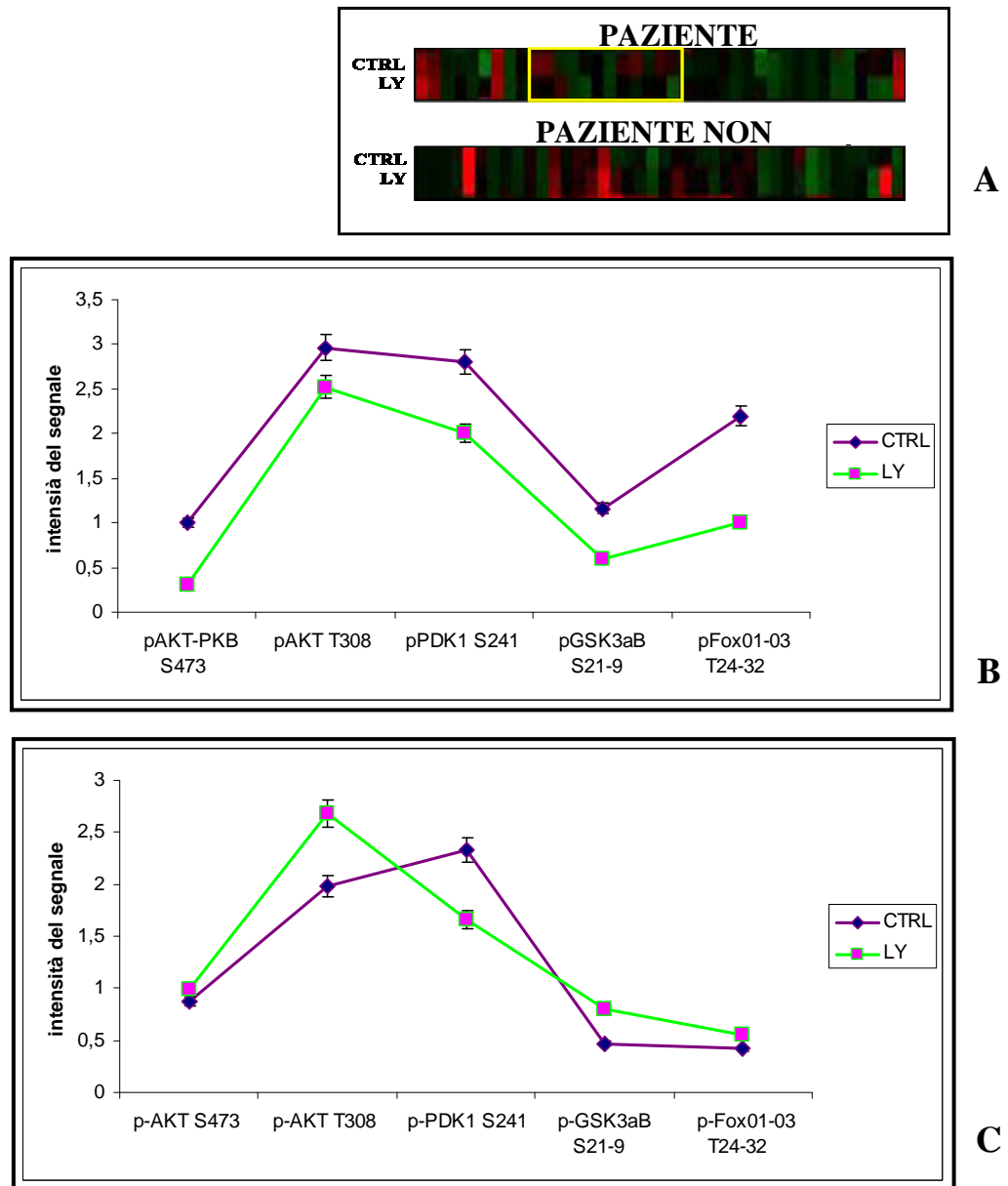
la fosfatasi PP2A, da cui dipende la fosforilazione della treonina 308 di Akt, sarebbe meno espressa in pazienti LAM.

A conferma di quanto descritto, il diverso comportamento delle due popolazioni e' stato analizzato anche mediante la tecnica del western blotting. Il risultato (FIG. 10 D, E, F) dimostra ancora una volta che tra i campioni con alti livelli di Akt fosforilato possiamo trovare una sottopopolazione non sensibile al trattamento con LY294002 in termini di variazioni nello stato di attivazione di Akt. Tali risultati sono particolarmente importanti a causa dell'interesse che i nuovi inibitori terapeutici dell'asse PI3K/AKT/mTOR, e dei suoi bersagli a valle, stanno suscitando, quali candidati sempre più attraenti per il trattamento di queste neoplasie.

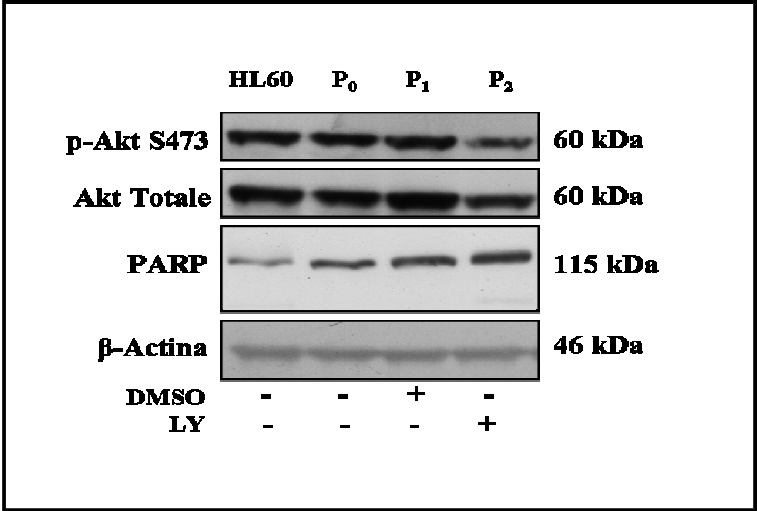


**FIG. 9**

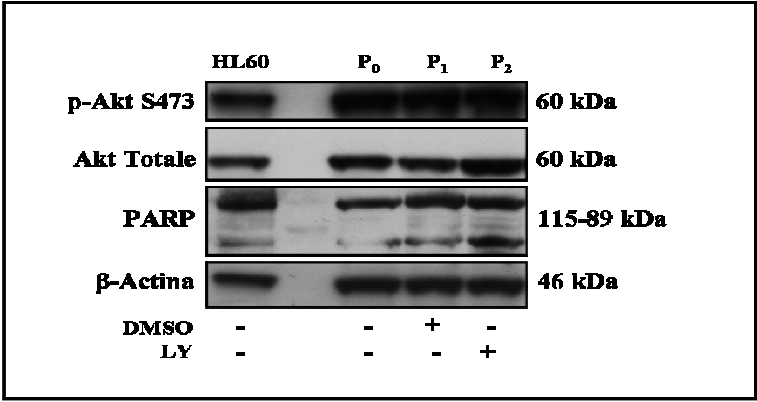




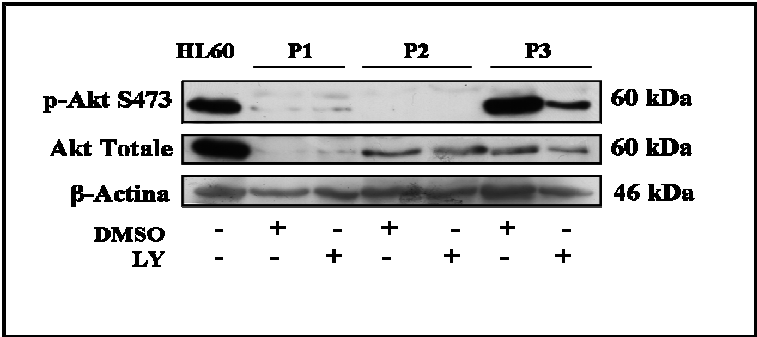
**FIG. 10**



D



E



F

FIG. 10

## **6.8 Trattamenti con inibitori specifici di Akt ed mTOR definiscono profili di pazienti responsivi e non**

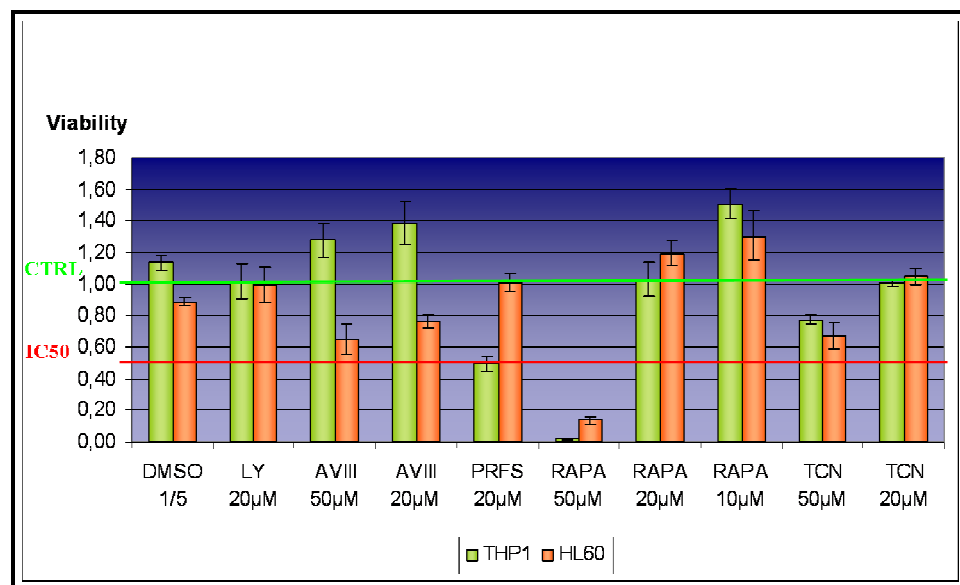
Poiché LY294002, benché potente e specifico inibitore di PI3K, non è utilizzabile nella pratica clinica, abbiamo cercato di approfondire la risposta di blasti da paziente LAM al trattamento con inibitori del pathway PI3K/AKT/mTOR utilizzati in trials clinici. Ci siamo concentrati sugli inibitori di Akt Perifosina, Triciribina e Inibitore VIII, e di mTOR rapamicina e Torin1.

Abbiamo utilizzato un dosaggio MTT effettuato su cellule promielocitiche THP1 e monocitiche HL60 per stabilire la IC50 e quindi le dosi ottimali per il trattamento dei blasti con tali inibitori. (FIG. 11).

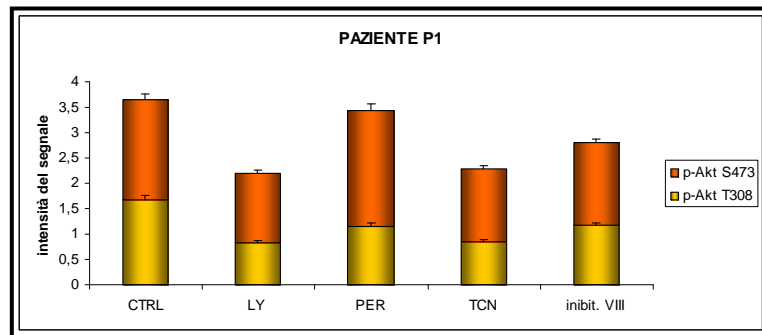
Gli inibitori specifici per Akt hanno provocato una riduzione della fosforilazione del loro bersaglio diretto (sia sulla S473 che sulla T308) solo sul 40% dei pazienti. Tuttavia va sottolineato che il trattamento ha avuto un effetto citotossico anche su alcuni campioni in cui la fosforilazione di Akt non si è abbassata, suggerendo che questo effetto sia stato mediato da altre proteine bersaglio. Quindi, anche blasti che non rispondono al trattamento con una riduzione di fosfoAkt potrebbero tuttavia essere sensibili al farmaco in termini di morte cellulare (FIG. 14).

Tra gli inibitori utilizzati, l'inibitore VIII e la Triciribina hanno mostrato una maggiore efficacia nell'inibizione della fosforilazione di Akt, rispetto alla perifosina (FIG. 12).

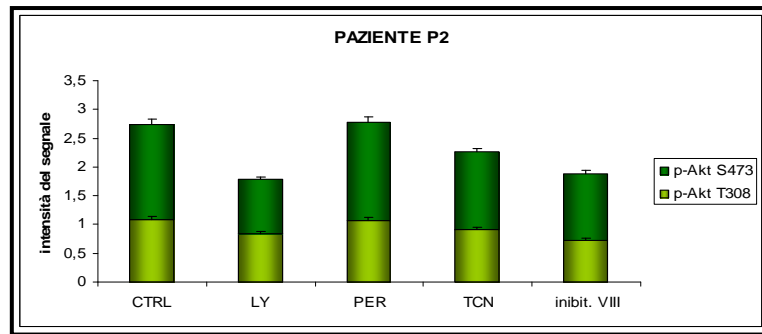
Per quanto riguarda gli inibitori specifici per mTOR, oltre a Rapamicina e' stato utilizzato l'inibitore Torin1 (PP30) poiche' si tratta di una molecola in grado di agire su entrambi i complessi mTORC1 ed mTORC2, e quindi di diminuire la crescita cellulare e la proliferazione in modo più efficace rispetto alla Rapamicina [Feldman et al., 2009]. In realta', l'efficacia di Torin1 sui blasti in coltura si e' rivelata inferiore a quella della rapamicina. Anche in questo caso, come nell'uso di LY294002, solo in alcuni dei campioni si e' osservata una diminuzione di fosforilazione dei target dell'inibitore. Nella figura 13 sono riportati gli esempi di due pazienti sensibili al trattamento con gli inibitori di mTOR e di un paziente resistente al trattamento, rappresentativi delle due popolazioni. Il trattamento con rapamicina ha avuto un effetto citotossico sui blasti LAM.



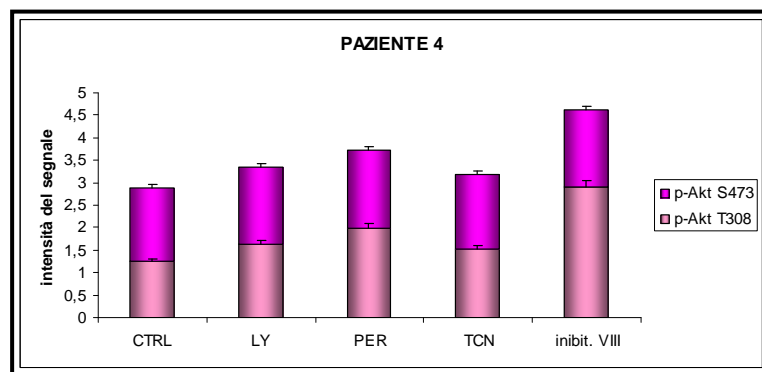
**FIG. 11**



**A**

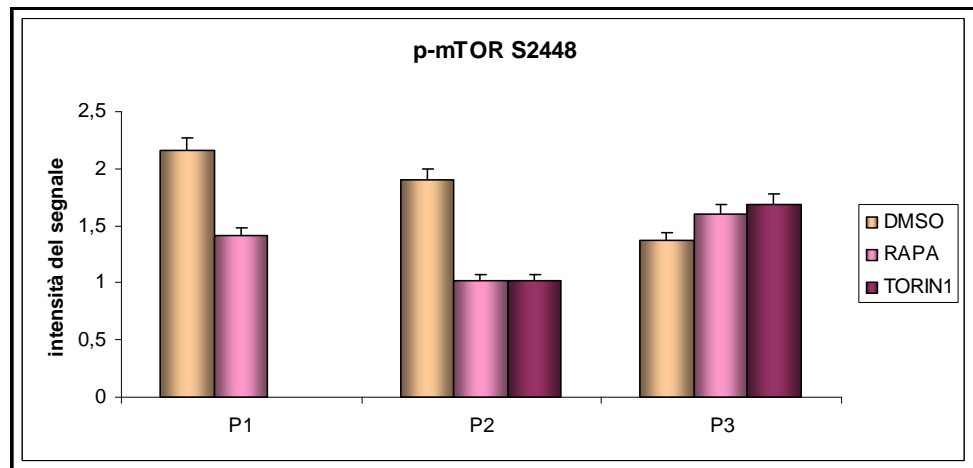


**B**

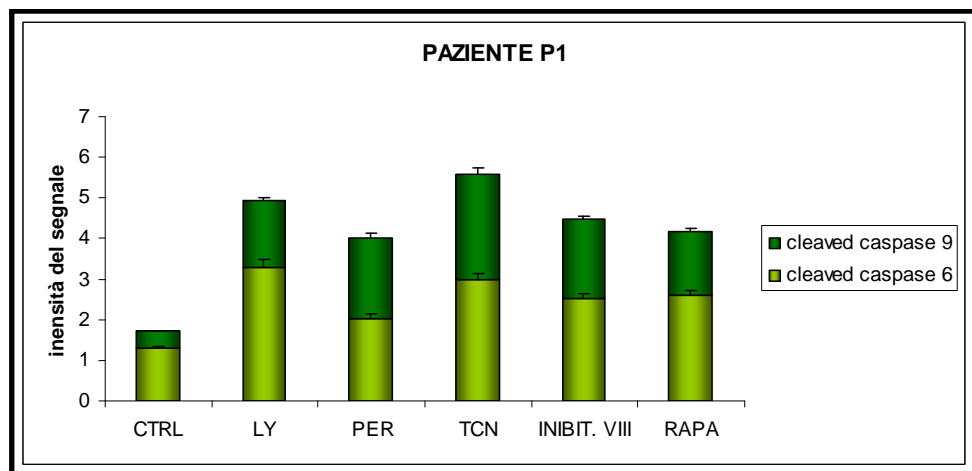


**C**

**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**

# DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato come la definizione del profilo fosfoproteomico della LAM arricchisca le attuali conoscenze relative a questa patologia di particolari importanti. Può in effetti essere utile per ampliare e rendere più dettagliati sia i sistemi di classificazione, sia i quadri di definizione di una prognosi.

Il motivo che ci ha spinti ad utilizzare la tecnologia RPPA va ricercato nella sensibilità di questo sistema, in grado di dare informazioni quantitative a partire da campioni ottenuti da un numero bassissimo di cellule, nella possibilità di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni, riducendo enormemente il rischio di errore sperimentale, e nella velocità che caratterizza la metodica.

La prima importante osservazione riguardo i campioni analizzati nel nostro studio è stata che sia che provenissero da sangue midollare, sia che provenissero da sangue periferico, mostravano gli stessi livelli di attivazione ed espressione proteica, per cui potevano essere utilizzati indifferentemente e paragonati tra loro. Infatti, campioni di sangue midollare e periferico di stessi pazienti sono stati analizzati in RPPA, per un elevato numero di endpoints, ed in Western Blotting, per alcune delle proteine chiave nel signalling cellulare, senza che fosse rilevata alcuna differenza significativa.

Inoltre, molti centri di ricerca hanno in passato stabilito delle biobanche di blasti LAM, ed è perciò fondamentale sapere se campioni prelevati lo stesso giorno dallo stesso paziente, freschi o crioconservati diano risultati paragonabili tra loro. La nostra analisi in RPPA ed in western blot ha, anche in questo caso, confermato questa ipotesi.

Siamo passati quindi all'analisi del fosforiloma di un gruppo di 60 pazienti LAM appartenenti a gruppi FAB da M0 a M5, mediante RPPA.

La heatmap generata da questo screening ha messo in evidenza una clusterizzazione dei pazienti dipendente dall'espressione e dallo stato di fosforilazione delle proteine analizzate (endpoints). Abbiamo quindi cercato una relazione tra le informazioni di fosfoproteomica che l'RPPA fornisce e le caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati, individuando una prima correlazione con la classificazione FAB.

I nostri dati mostrano infatti che esiste una differenza significativa nell'espressione e fosforilazione di 17 proteine di segnale tra i tipi FAB M1/M2 (leucemie mieloidi) ed M4/M5 (leucemie monocitiche).

Questi dati potrebbero essere utilizzati per suggerire una terapia farmacologica mirata in base al tipo di classificazione FAB. Ad esempio l'espressione e l'attivazione di proteine collegate ai processi apoptotici, come la caspasi 9 clivata, p-BAD S136/S112, p-STAT3, è più alta nei FAB M1/M2 rispetto agli M4/M5 mentre al contrario i livelli di espressione e



fosforilazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale come p-Akt S473/T308, p-PKC, p-P38 sono più alti nei sottotipi monocitici.

Questo *pattern* suggerisce che l'inefficacia della chemioterapia in pazienti LAM M1/M2 potrebbe dipendere da una resistenza all'apoptosi; mentre la resistenza ai chemioterapici di pazienti LAM M4/M5 potrebbe dipendere da una iperattivazione dei *pathways* proliferativi e antiapoptotici.

Allo stesso modo, abbiamo notato una correlazione tra l'espressione e l'attivazione di alcuni endpoints e il tipo di prognosi associata a ciascun paziente. I nostri dati mostrano che 15 proteine sono espresse e fosforilate differenzialmente tra pazienti con prognosi favorevole e pazienti con prognosi intermedia/inausta.

Abbiamo voluto considerare in un unico gruppo le prognosi intermedie e infauste, poiché di fatto, i clinici suggeriscono che molto spesso il passo da intermedio a infausto è dettato semplicemente dall'età avanzata del paziente.

In particolare i pazienti con prognosi favorevole hanno, ad esempio, livelli di p-AktS473/308, p-mTOR, p-P38, p-PKC, p-ERK1/2 ed altre proteine coinvolte nei pathways di proliferazione cellulare e *survival* più bassi rispetto ai pazienti con prognosi intermedia o infausta.

La motivazione di ciò può essere ricercata nel fatto che l'attivazione aberrante di questi pathways, nei pazienti con prognosi intermedia o infausta, rende la patologia più aggressiva, poiché favorisce la

proliferazione delle cellule leucemiche e l'inibizione dei fenomeni apoptotici, e la speranza di una remissione si abbassa.

Ciò che appare chiaro, a questo punto, è che una iperattivazione di Akt correla con una prognosi peggiore.

Abbiamo poi osservato che pazienti che mostrano un' iperattivazione dell'asse PI3K/Akt possiedono alti livelli di espressione del recettore c-Kit.

Il dato relativo all'espressione di questo recettore è stato ottenuto mediante analisi di immunofenotipizzazione in citofluorimetria. Recenti pubblicazioni hanno correlato un'alta espressione di c-Kit ad una speranza di vita ridotta e un aumento delle possibilità di ricaduta. L'overespressione di questo recettore tirosin chinasi potrebbe influire negativamente sul decorso della malattia attraverso l' incremento dell'attivazione di Akt, mediato da PI3K, e di tutti i suoi effettori a valle.

Valutando i livelli di p-Akt dei pazienti analizzati in questo studio, mediante RPPA, abbiamo notato che, in accordo con quanto riportato in letteratura, in circa il 60% di essi, questi livelli sono alti. Infatti, Akt è considerato un possibile target terapeutico per la LAM. Pertanto, abbiamo trattato una serie di campioni di blasti LAM, caratterizzati da alti livelli di p-Akt, con l'inibitore di PI3K/Akt LY294002. Abbiamo così individuato un gruppo di pazienti i cui blasti in coltura sono responsivi al trattamento ed un gruppo di pazienti resistenti. Questa osservazione ci ha suggerito che si possa a predire la risposta di un paziente LAM agli inibitori dell'asse

PI3K/Akt/mTOR, prima di iniziare il trattamento farmacologico con tali inibitori.

Una serie di inibitori di Akt e per mTOR sono stati quindi selezionati per la loro specificità di bersaglio e perché già inclusi in trials clinici di fase I e II per il trattamento della leucemia mieloide acuta.

Campioni di blasti LAM sono stati trattati con gli inibitori di Akt Perifosina (Fase II), Triciribina (Fase I) e Inibitore VIII (Fase I) e con gli inibitori di mTOR Rapamicina (Fase II) e Torin1 (inibitore non disponibile commercialmente).

I dati ottenuti in RPPA mostrano che una parte dei pazienti LAM ha risposto al trattamento con una riduzione della fosforilazione dei bersagli specifici p-Akt S473, p-Akt T308 e p-mTOR S2448; allo stesso tempo si è registrato in questi stessi campioni un incremento dei processi legati all'apoptosi, documentato dall'aumento di espressione delle caspasi clivate 9 e 6.

Questi dati forniscono una base da cui partire per lo sviluppo di farmacoterapie personalizzate, volte a colpire target specifici, nella leucemia mieloide acuta.

# CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

L'obiettivo di questo progetto era quello di caratterizzare i fenotipi di trasduzione del segnale in pazienti di leucemia mieloide acuta, usando la reverse phase protein array, e utilizzare quindi le informazioni ottenute per una classificazione delle LAM basata sulle vie di segnale. Infatti, negli ultimi anni e' emerso chiaramente che le attuali conoscenze sui meccanismi molecolari alla base della LAM si fondano in gran parte su osservazioni condotte su linee cellulari, che non sempre rispecchiano la realta' di cio' che avviene nel tumore in situ. Inoltre, anche quando gli studi sono condotti su blasti da paziente, la maggior parte degli approcci metodologici consente di osservare simultaneamente il profilo di espressione o di fosforilazione di un numero limitato di proteine di segnale, in un numero altrettanto limitato di campioni.

Per la sua versatilita', l'elevato numero di campioni e di endpoints analizzabili contemporaneamente, e per il bassissimo numero di cellule richiesto per l'analisi, la RPPA si presta invece ad uno studio mirato ad ottenere una classificazione dei pazienti, in base al fenotipo di rete di segnali, clinicamente rilevante.

L' ampia descrizione delle reti di segnalazione intracellulare di cellule LAM cosi' ottenuta ci ha infatti permesso di individuare profili unici, o

molecular signatures, nei pathways delle cellule tumorali che correlano sia con il profilo genetico che con l'esito della malattia.

Inoltre, non ci siamo limitati a descrivere i livelli basali di fosforilazione delle proteine, ma, grazie a questo approccio, e' stato possibile esporre cellule LAM fresche ad inibitori di specifiche reti. Sorprendentemente, i blasti rispondo a questi trattamenti abbassando i livelli di fosfoproteine specifiche in modo molto diverso da paziente a paziente. In particolare, e' stato possibile individuare delle sottopopolazioni di campioni che, pur avendo alti livelli di fosfoAkt, non rispondono ad alcun inibitore di questa chinasi. Va considerato che i pazienti con LAM possiedono sottopopolazioni cellulari multiple, che potrebbero rispecchiare l'eterogeneità sia nel fosforiloma generale sia nella risposta al trattamento farmacologico.

In conclusione, possiamo affermare che

- la tecnologia reverse phase protein array applicata alla leucemia mieloide acuta permette di confrontare simultaneamente molteplici reti di segnalazione in un numero molto elevato di campioni, e di ottenere perciò una fotografia dell'espressione e della fosforilazione delle principali reti
- la definizione di profili proteomici può essere applicata alla classificazione della LAM

- abbiamo confermato che nell'asse di segnale PI3K/Akt/mTOR può essere considerato un buon target terapeutico nella LAM

-abbiamo proposto un modello utile per predire la risposta di pazienti LAM a trattamenti con inibitori di questo pathway.

Pensiamo che la fotografia da noi ottenuta, se da un lato rispecchia meglio l'eterogeneità dei pazienti, dall'altro permette di identificare dei punti critici che meritano di essere approfonditi.

In futuro, ci proponiamo infatti di utilizzare la citometria a flusso per studi mirati su pochi endpoints, per ottenere informazioni precise e veloci sia sul profilo di fosforilazione nelle diverse sottopopolazioni di un paziente LAM, sia sulle modificazioni indotte su questo profilo da un trattamento farmacologico con inibitori di specifiche chinasi.

## BIBLIOGRAFIA

- Advani AS, Rodriguez C, Jin T. Increased c-Kit intensity is a poor prognostic factor for progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed AML. *Leuk Res*, 2008, 32:913-918.
- Amancio Carnero. The PKB/AKT Pathway in Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, 16, 34-44.
- Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*. 1997, 272, 50:31515-24.
- Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukaemia progression. *Leukemia*, 2009, 23, 12:2233-2241.
- Bai L, Wang Y, Fan J, Chen Y, Ji W, Qu A, Xu P, James DE, Xu T. Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action. *Cell Metab* 2007, 5:47–57.
- Baumgartner B, Weber M, Quirling M, Fischer C, Page S, Adam M, et al. Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts. *Leukemia*. 2002;16(10):2062-71.
- Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I, Fletcher LM, Cooke FT, Tavaré JM. Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 2004, 117:5985–5993.
- Birkenkamp KU, Geugien M, Schepers H, Westra J, Lemmink HH, Vellenga E. Constitutive NFkappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia* 2004;18:103–12.
- Böhm A, Aichberger KJ, Mayerhofer M, Herrmann H, Florian S, Krauth MT, Derdak S, Samorapoompichit P, Sonneck K, Vales A, Gleixner KV, Pickl WF, et al. Targeting of mTOR is associated with decreased growth and decreased VEGF expression in acute myeloid leukaemia cells. *Eur J Clin Invest* 2009;39:395–405.
- Bousquet M, Recher C, Queleen C, Demur C, Payrastra B, Brousset P. Assessment of somatic mutations in phosphatidylinositol 3-kinase gene in human lymphoma and acute leukaemia. *Br J Haematol* 2005;131:411–3.
- Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J, Buerger H, Müller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem

- duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res* 2005;65:9643–50.
- Brognard J, Sierrecki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*. 2007, 25,6:917-31.
  - Bryan L. Betz, PhD; Jay L. Hess, MD, PhD, Acute Myeloid Leukemia Diagnosis in the 21st Century Arch Pathol Lab Med—Vol 134, October 2010
  - Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 1998, 273:7201–7204.
  - Carson C. Thoreen, Seong A. Kang, Jae Won Chang¶, Qingsong Liu¶, Jianming Zhang¶, Yi Gao, Laurie J. Reichling, Taebo Sim¶, David M. Sabatini, and Nathanael S. Gray. An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-resistant Functions of mTORC1. *JBC* 2009, 284, 12: 8023–8032.
  - Crazzolara R, Cisterne A, Thien M, Hewson J, Baraz R, Bradstock KF, Bendall LJ. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009, 113:3297–306.
  - Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 2002;3:631–643.
  - De Toni F, Racaud-Sultan C, Chicanne G, Mas VM, Cariven C, Mesange F, et al. A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2006;25(22):3113-22.
  - delPeso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997, 278:687–689.
  - Doepfner KT, Spertini O, Arcaro A. Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Leukemia* 2007;21:1921–30.
  - Dos Santos C, Recher C, Demur C, Payrastre B. [The PI3K/Akt/mTOR pathway: a new therapeutic target in the treatment of acute myeloid leukemia]. *Bull Cancer*. 2006;93(5):445-7.
  - Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal* 2009, 21:827–35.



- Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 2002, 13:2276–2288.
- Eguez L, Lee A, Chavez JA, Miinea CP, Kane S, Lienhard GE, McGraw TE. Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* 2005, 2:263–272.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004, 64:3892–3899.
- Faderl S, Pal A, Bornmann W, Albitar M, Maxwell D, Van Q, Peng Z, Harris D, Liu Z, Hazan- Halevy I, Kantarjian HM, Estrov Z. Kit inhibitor APcK110 induces apoptosis and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 2009;69:3910–7.
- Fayard, E., Tintignac, L. A., Baudry, A. and Hemmings, B. A. Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.* 2005, 118, 5675– 5678
- Feldman Morris E., Beth Apsel, Aino Uotila, Robbie Loewith, Zachary A. Knight, Davide Ruggero, Kevan M. Shokat. Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PloS Biol.* 2009, 10:7(2).
- Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, Burks JK, Mnjoyan Z, Andreeff M. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood* 2009;113:1504–12.
- Fierro FA, Brenner S, Oelschlaegel U, Jacobi A, Knoth H, Ehninger G, Illmer T, Bornhauser M. Combining SDF-1/CXCR4 antagonism and chemotherapy in relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2009;23:393–6.
- Foster DA, Toschi A. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 2009, 8:1026–9.
- Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A. and Sabatini, D. M. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2 s. *Curr. Biol.* 2006 16, 1865–1870
- Fu L, Kim YA, Wang X, Wu X, Yue P, Lonial S, Khuri FR, Sun SY. Perifosine Inhibits Mammalian Target of Rapamycin Signaling through Facilitating Degradation of Major Components in the mTOR Axis and Induces Autophagy. *Cancer Res* 2009, 69:8967–76.
- Gallay N, Dos Santos C, Cuzin L, Bousquet M, Simmonet Gouy V, Chaussade C, Attal M, Payrastre B, Demur C, Recher C. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is

- associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2009;23:1029–38.
- Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*. 2005, 18, 1:13-24.
  - Garcia-Martinez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 2008, 416:375–85.
  - Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. PI3-kinase/ Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 2005;19:586–94.
  - Griessinger E, Imbert V, Lagadec P, Gonthier N, Dubreuil P, Romanelli A, et al. AS602868, a dual inhibitor of IKK2 and FLT3 to target AML cells. *Leukemia*. 2007;21(5):877-85.
  - Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH, Mullholland DJ, Magnuson MA, Wu H, Sabatini DM. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 2009, 15:148–59.
  - Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J. and Sabatini, D. M. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell*. 2006 11, 859–871.
  - Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2001;98(8): 2301-7.
  - Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(25):16220-5.
  - Hanada, M., Feng, J. and Hemmings, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 11, 3–16
  - Hodgkinson, C. P., Sale, E. M. and Sale, G. J. Characterization of PDK2 activity against PKB g. *Biochemistry* 2002, 41, 10351–10359
  - Hresko, R. C. and Mueckler, M. mTOR\_RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein pinase B in 3T3-L1 adipocytes *J. Biol. Chem*. 2005 280, 40406–40416.
  - Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 2009, 37:217–22.

- Imai N, Miwa H, Shikami M, Suganuma K, Gotoh M, Hiramatsu A, Wakabayashi M, Watarai M, Hanamura I, Imamura A, Mihara H, Shitara K, et al. Growth inhibition of AML cells with specific chromosome abnormalities by monoclonal antibodies to receptors for vascular endothelial growth factor. *Leuk Res* 2009;33:1650–7.
- Irish J M, Randi Hovland, Peter O Krutzik, Omar D Perez, Øystein Bruserud, Bjørn T Gjertsen and Garry P Nolan , Single Cell Profiling of Potentiated Phospho-Protein Networks in Cancer Cells. *Cell* 2004, 118:217–228.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004, 6:1122–8.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006, 127, 125–137.
- Joshua L. Shipley and James N. Butera Acute myelogenous leukemia *Experimental Hematology* 2009;37:649–658
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3–L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996, 271:31372–31378.
- Kornblau SM, Raoul Tibes, Yi Hua Qiu, Wenjing Chen, Hagop M Kantarjian, Michael Andreeff, Kevin R Coombes, and Gordon B Mills. Functional proteomic profiling of AML predicts response and survival. *Blood*, 2009, 113, 1:154-164.
- Kornblau SM, Tibes R, Qiu YH, Chen W, Kantarjian HM, Andreeff M, Coombes KR, Mills GB. Functional proteomic profiling of AML predicts response and survival. *Blood* 2009;113:154–64.
- Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva M, Estey EH, Andreeff M. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2006;108:2358–65.
- leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* 2009;23:2233–41
- Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting. PGC-1 $\alpha$  transcription coactivator. *Nature*. Published online June 6, 2007.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002, 8:1153–1160.

- Lum JJ, Bui T, Gruber M, Gordan JD, DeBerardinis RJ, Covello KL, Simon MC, Thompson CB. The transcription factor HIF-1 $\alpha$  plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev* 2007, 21:1037–1049.
- Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 2005, 24:7465–7474.
- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006, 25:6416–22.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating Downstream. *Cell* 2007, 129, 1261–1274.
- Maraldi T, Bertacchini J, Benincasa M, Guida M, De Pol A, Liotta LA, Petricoin E 3rd, Cocco L, Marmiroli S. Reverse Phase Protein Microarrays (RPPA) as a diagnostic and therapeutic guide in multidrug resistant leukemia. *Int J Oncol.* 2010 Dec 2. doi: 10.3892/ijo.2010.850. [Epub ahead of print]
- Matsunaga T, Fukai F, Miura S, Nakane Y, Owaki T, Kodama H, Tanaka M, Nagaya T, Takimoto R, Takayama T, Niitsu Y. Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2008;22:353–60.
- Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M, Kato J, Hirayama Y, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* 2003;9:1158–65
- Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:11598–11603.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(8):1263-84.
- McDonald PC, Oloumi A, Mills J, Dobrev I, Maidan M, Gray V, Wederell ED, Bally MB, Foster LJ, Dedhar S. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res* 2008;68:1618–24.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000, 404:782–787.
- Migawa MT, Drach JR and Townsend LB. *J. Med. Chem.* 2005, 48: 3840-3851.

- Min YH, Cheong JW, Kim JY, Eom JI, Lee ST, Hahn JS, Ko YW, Lee MH. Cytoplasmic mislocalization of p27Kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64:5225–31.
- Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS, Ko YW. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 2003;17:995–7.
- Muranyi, Dedhar S, Hogge DE. Combined inhibition of integrin linked kinase and FMS-like tyrosine kinase 3 is cytotoxic to acute myeloid leukemia progenitor cells. *Exp Hematol* 2009;37:450–60.
- Pearn L, Fisher J, Burnett AK, Darley RL. The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras. *Blood* 2007;109:4461–9.
- Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, Stadler CR, Rawat VP, Deshpande AJ, et al. A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *J Exp Med.* 2008;205(3):515-22.
- Qingsong Liu, Jae Won Chang, Jinhua Wang, Seong A. Kang, Carson C. Thoreen, Andrew Markhard, Wooyoung Hur, Jianming Zhang, Taebo Sim, David M. Sabatini, and Nathanael S. Gray. Discovery of 1-(4-(Propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1*H*)-one as a Highly Potent, Selective Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor for the Treatment of Cancer . *Med. Chem.*, 2010, 53, 19:7146-7155.
- Rahmani M, Reese E, Dai Y, Bauer C, Payne SG, Dent P, Spiegel S, Grant S. Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005, 65:2422–32.
- Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005, 105:2527–34.
- Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 2006, 25:4683–4696.
- Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* 2000;14(5):505-20
- Rowe JM. Why is clinical progress in acute myelogenous leukemia so slow? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(1):1-3.

- Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 2003, 278:14599–14602.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005, 307:1098–101.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005, 307, 1098–1101.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97:10832-7.
- Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;128:324–32.
- Sekimoto T, Fukumoto M, Yoneda Y. 14–3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157- phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J* 2004, 23:1934–1942.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994, 269:23757–23763.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:721–732.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002, 8:1145–1152
- Shiota, C., Woo, J. T., Lindner, J., Shelton, K. D. and Magnuson, M. A. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev. Cell* 2006 11, 583–589.
- Skeen JE, Bhaskar PT, Chen CC, Chen WS, Peng XD, Nogueira V, Hahn-Windgassen A, Kiyokawa H, Hay N. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* 2006, 10:269–280.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998, 95,1:29-39
- Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK,

PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*. 2008; 22(4):686-707.

- Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Hayflick JS, Prie N, Verdier F, et al. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2005;106(3):1063-6.
- Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Hayflick JS, Prie N, Verdier F, Vanhaesebroeck B, Muller O, Pesce F, Ifrah N, Hunault-Berger M, Berthou C, et al. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:1063–6.
- Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW, Ericsson J. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF-FBW7. *Cell Metab* 2005;1:379–391.
- Tabe Y, Jin L, Tsutsumi-Ishii Y, Xu Y, McQueen T, Priebe W, Mills GB, Ohsaka A, Nagaoka I, Andreeff M, Konopleva M. Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res* 2007;67:684–94.
- Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem* 1999, 274:33085–33091.
- Tamburini J, Elie C, Bardet V, Chapuis N, Park S, Broet P, Cornillet-Lefebvre P, Lioure B, Ugo V, Blanchet O, Ifrah N, Witz F, et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood* 2007;110:1025–8
- Tamburini J, Elie C, Bardet V, Chapuis N, Park S, Broet P, et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood*. 2007;110(3):1025-8.
- Tamburini J, Green AS, Chapuis N, Bardet V, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. Targeting translation in acute myeloid leukemia: A new paradigm for therapy? *Cell Cycle* 2009;8:3893–9.
- Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, Evangelisti C, Papa V, Grafone T, Martinelli G, Conte R, Cocco L, McCubrey JA, Martelli AM. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia* 2007;21:427–38.

- Tazzari PL, Tabellini G, Ricci F, Papa V, Bortul R, Chiarini F, Evangelisti C, Martinelli G, Bontadini A, Cocco L, McCubrey JA, Martelli AM. Synergistic proapoptotic activity of recombinant TRAIL plus the Akt inhibitor Perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2008, 68:9394–403.
- Thomas, C. C., Deak, M., Alessi, D. R. and van Aalten, D. M. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr. Biol.* 2002, 12, 1256–1262.
- Tibes R, Kornblau SM, Qiu Y, Mousses SM, Robbins C, Moses T, Carpten JD. PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation. *Br J Haematol* 2008;140:344–7.
- Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003, 2003:RE5.
- Valencia A, Roman-Gomez J, Cervera J, Such E, Barragan E, Bolufer P, et al. Wnt signalling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(9): 1658-66.
- Van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* 2008;14:2061–74.
- Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000; 20:5010–8.
- Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsichlis P, Bellacosa A, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002, 8:1136–1144.
- Wahner Hendrickson AE, Haluska P, Schneider PA, Loegering DA, Peterson KL, Attar R, Smith BD, Erlichman C, Gottardis M, Karp JE, Carboni JM, Kaufmann SH. Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-1 receptor in human acute myelogenous leukemia: effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 *in vitro*. *Cancer Res* 2009; 69:7635–43.
- Weinstein I. B. Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. *Science* 2002, 297:63-4.
- Wen-I Wu, Walter C. Voegtli, Hillary L. Sturgis, Faith P. Dizon, Guy P. A. Vigers, Barbara J. Brandhuber Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. *PLoS ONE* 2010, 5(9).



- Wotring LL, Crabtree GW, Edwards NL, Parks Jr RE and Townsend LB. *Cancer treat Rep.* 1986, 70:491-497.
- Wu J, Wong WW, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2004;64(18):6461-8.
- Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003;102:972–80.
- Xu Q, Thompson JE, Carroll M. mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. *Blood* 2005, 106:4261–8.
- Yang, Z. Z. Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E. and Hemmings, B. A. Protein kinaseB $\alpha$ /Akt1 regulates placental development and fetal growth, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:32124–32131.
- Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *EMBO J* 1998, 17:5085–5094.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001, 3:973–982.